

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



---

**INHIBIDORES DE LA PROTEÍNA DE  
DIVISIÓN CELULAR BACTERIANA FtsZ  
DIRIGIDOS AL SITIO DE UNIÓN DEL  
NUCLEÓTIDO**

---

TESIS DOCTORAL

**Albert Vergoñós Tomàs**

Madrid, 2017



Directora de Tesis: Dra. Sonia Huecas Gayo

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

CSIC, Madrid







“La simplicidad es el logro final. Después de que uno haya jugado con una cantidad grande de notas, es la simplicidad que emerge como una recompensa del arte”.

Frédéric Chopin



## AGRADECIMIENTOS

He tenido la suerte de recibir el cariño, el amor y la paciencia de las siguientes personas:

Mis padres y mi hermana, que me han dado su amor incondicional SIEMPRE. Us estimo i us dedico aquesta tesi. Mi directora de tesis, Sonia Huecas, y José Manuel Andreu, que me han guiado, apoyado e inspirado para que siguiera aprendiendo. Marian, Lidia, Laura, David, Álex, Rubén, Mariano (eres bueno, tío...), Paco (que siempre me lía para unas cañas), Juan, Dani, Javier, Fernando, Fer, Isabel, Benet, Eli, Chiara, Patricia...con quien he compartido momentos de trabajo, risas y conocimiento. El grupo de Química Médica del departamento de Química Orgánica I de la UCM: María Luz, Marta, Henar y Mar; el grupo de Bioinformática Estructural del Instituto de Química Física Rocasolano: Pablo, Erney y Mon. En resumen, quiero agradecer a toda la gente con la que he tenido el privilegio de trabajar. Por la ayuda, la amabilidad y la curiosidad científica, dentro y fuera del laboratorio.

Lucía, a quien admiro y con quien he crecido a pasos de gigante. A pesar de mis tropiezos, siempre has sabido estar ahí para inspirarme. Gonzalo Sáez a quien veo poco, llamo poco y tuve la indecencia de no ir a su tesis. Me lo perdona, por todos los buenos ratos que hemos pasado. La gente que me alegra de lunes a viernes: Noelia (que sabe animar a un agorero), Ruth (que siempre da buenos consejos), Marta, Ana, Sara, Marina, Conchi, Bego, Merce, Carlos y Hugo. Luque, que tiene un sentido del humor privilegiado y merece una mención aparte, por todo lo que me ha hecho reír. Toda la gente del CIB que hace que este centro funcione y que no reciben el reconocimiento merecido (como ocurre en tantos otros centros de investigación en este país).

Fede, Nieves y Bruma, que han sido mi luz en días nublados y se han ganado el cielo. El resto de mi familia Vannini. Vero, que veía mi futuro en las cartas bajo mi mirada escéptica. Gonzalo Vilella, que su amistad es más grande que las galaxias que estudia. Edu, con quien tuve la suerte de reencontrarme en Madrid y ha sido un amigo cercano todos estos años. Todos mis amigos de Lleida, en especial Alejandro y Ricard. Los biofísicos y biofísicas madrileños: Clara, Álvaro, Adri y Dani, científicos excelentes y mejores personas. Saray, que me enseñó que la música también se puede bailar. Mis amigos de las clases de Lindy Hop, que tienen mucho arte. Mi familia madrileña que me adoptó y me hacen feliz: Laura (repito por ser una gran amiga, dentro y fuera del labo), Bort, María, Sito, el “pequeñajo” Héctor, Miguel, Patri, Pablo, Sara, Richi, Pongo, Anita, Barbie, Suso, Tini, la pequeña Candela, Elvis, Bea, Álvaro, Evor, Belén, Pode, Walter, Anabel, Rodri, Irene, Paloma, Susana, Guille, Nago, Ru, la peque Lea, Nacho, Cris, y los ya no tan pequeñajos Nico y Luna. Amigos que me acogieron en Grenoble, al PATBAC team, en especial Marko, que me hizo sentir como en casa. Carlos, por su acogida y por su ayuda para entender la cristalografía y a los franceses.

El resto de personas que os habéis cruzado en mi camino dejando huella. Siempre en mis pensamientos. Como yo estuve en los pensamientos de aquellos que ya se fueron y dedicaron su vida a grabarme a fuego sus enseñanzas: mis abuelos.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>1</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>5</b>
I.1 El divisoma y el citoesqueleto bacteriano	7
I.2 Estructura y función de FtsZ	15
I.3 Desarrollo de nuevos antibióticos	21
I.4 Inhibidores de FtsZ	24
I.5 Búsqueda de inhibidores de FtsZ mediante métodos computacionales: cribado virtual	29
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
III.1 Reactivos, tampones y medios empleados	37
III.2 Producción de FtsZ de distintas especies	38
III.2.1 Transformación de células de <i>E. coli</i>	38
III.2.2 Expresión de FtsZ en células transformadas	40
III.2.3 Purificación de FtsZ de <i>Bacillus subtilis</i>	41
III.2.4 Purificación de FtsZ de <i>Staphylococcus aureus</i>	43
III.2.5 Determinación de la concentración de BsFtsZ purificada	44
III.2.5.1 Método de doble longitud de onda	44
III.2.5.2 Método de extracción del nucleótido con HClO <sub>4</sub>	45
III.2.6 Determinación de la concentración de SaFtsZ purificada	46
III.2.7 Determinación del grado de homogeneidad de la proteína obtenida	46
III.2.7.1 Dispersión dinámica de luz	46
III.2.7.2 Ultracentrifugación Analítica (AUC) – velocidad de sedimentación	47
III.3 Origen y selección de los compuestos empleados	47
III.3.1 Preparación de stocks de los compuestos en DMSO	49
III.3.2 Determinación de la solubilidad de los ligandos en el tampón experimental	50
III.3.3 Comprobación por HPLC-MS de la pureza e identidad química de los compuestos comprados	50
III.4 Métodos de competición de los ligandos por el sitio de unión del GTP en FtsZ	51
III.4.1 Método de desplazamiento de <i>mant</i> -GTP: determinación de la afinidad de unión al sitio del GTP por cambios en la anisotropía de fluorescencia	51
III.4.2 Método de competición con <sup>3</sup> H-GTP	54

III.5	Efecto de los ligandos en el ensamblaje de la proteína	55
III.5.1	Ensayo de sedimentación de polímeros de FtsZ	56
III.5.2	Ensayo de sedimentación de microtúbulos	57
III.5.3	Ensayo de dispersión de luz	58
III.5.4	Observación por microscopía electrónica de los polímeros formados	58
III.6	Cristalografía de complejos FtsZ-ligando	59
III.6.1	Estado de agregación de la preparación de BsFtsZ para cristalografía	59
III.6.2	Preparación de los cristales de proteína en presencia de ligando	60
III.6.3	Procesamiento de los datos y resolución de la estructura cristalográfica	64
III.7	Efecto de los compuestos en células bacterianas	66
III.7.1	Determinación de la actividad antibacteriana	66
III.7.2	Estudio del fenotipo bacteriano y test de viabilidad celular	67
III.7.3	Estudio de la localización celular del anillo Z	68
III.7.4	Inmunofluorescencia en células bacterianas	69
III.8	Efecto de los compuestos en líneas celulares humanas	69
III.8.1	Ensayos de citotoxicidad	69
III.8.2	Ensayos de inmunofluorescencia indirecta	70
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
IV.1	Optimización de compuestos derivados de bifenilo	73
IV.1.1	Punto de partida	73
IV.1.2	Afinidad de unión por el sitio del GTP en BsFtsZ y actividad antibacteriana	75
IV.1.3	Relación entre la afinidad de unión a FtsZ y la actividad antibacteriana de los compuestos	81
IV.1.4	Inhibición del ensamblaje de FtsZ y selectividad frente a tubulina	84
IV.1.5	Medida directa de la unión de UCM81 al sitio del GTP por ultracentrifugación analítica	87
IV.1.6	Efecto de los inhibidores en células de <i>B. subtilis</i> y en células humanas	90
IV.2	Compuestos con afinidad por el sitio de unión del GTP en FtsZ obtenidos a partir de cribado virtual	96
IV.2.1	Efecto de VS2.18 en la polimerización de BsFtsZ	102
IV.2.2	Nuevos ligandos basados en VS2.18	104
IV.2.3	Unión de VS2.25 a FtsZ detectada por ultracentrifugación analítica	107
IV.2.4	Nuevos compuestos basados en VS2.18 y VS2.25	109
IV.2.5	Perfil citológico de los inhibidores de FtsZ	115
IV.2.6	Toxicidad de los inhibidores de FtsZ en líneas celulares humanas	121
IV.2.7	Modulación del ensamblaje de FtsZ por los inhibidores	123
IV.2.8	Ensayos de unión directa de VS2.33 a BsFtsZ	127

IV.2.9	Cristalografía del complejo proteína-ligando (BsFtsZ-VS2.33)	130
IV.3	Otros compuestos de la quimioteca UCM y de la literatura	132
V.	DISCUSIÓN	141
V.1	Ligandos polifenólicos con núcleo de bifenilo compiten por el sitio de unión del nucleótido en BsFtsZ y presentan actividad antibacteriana en múltiples cepas	143
V.1.1	Los compuestos con núcleo de bifenilo producen filamentación de las células de <i>B. subtilis</i> y deslocalización del anillo Z	145
V.1.2	UCM81, el ligando más efectivo de la serie, inhibe moderadamente el ensamblaje de los polímeros de FtsZ formando dímeros	147
V.1.3	Modelo de unión de UCM81 a BsFtsZ determinado por dinámica molecular	148
V.2	Ligandos afines al sitio de GTP en BsFtsZ y con actividad antibacteriana, seleccionados a partir de un cribado virtual	150
V.2.1	VS2.25, VS2.33, VS2.34, VS2.35, VS2.36, VS2.48 y VS2.58 inhiben la polimerización de BsFtsZ	152
V.2.2	Los ligandos VS2.25 y VS2.33 inhiben efectivamente la división celular de <i>B. subtilis</i>	153
V.2.3	Modelo de la unión del ligando VS2.33 a BsFtsZ determinado por dinámica molecular	154
VI.	CONCLUSIONES	157
VII.	MATERIAL SUPLEMENTARIO	161
VII.1	Curvas de desplazamiento del <i>mant</i> -GTP	163
VII.2	Comprobación de la pureza e identidad química de los ligandos por HPLC-MS y RMN de los inhibidores más relevantes seleccionados por cribado virtual	170
VIII.	BIBLIOGRAFÍA	179





## ABREVIATURAS

<u>Abreviatura</u>	<u>Significado</u>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
APS	Persulfato amónico
BSA	Albúmina de suero bovino
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DFMBA	2,6-difluoro-3-hidroxibenzamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-D6	Dimetilsulfóxido deuterado
FTTC	Fluoresceína-5-isotiocianato
FM4-64	N-(3-trietilamoniopropil)-4-(4-dietilaminofenilhexatrienil)piridinio dibromo
GdmCl	Cloruro de guanidinio
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
GFP	Proteína fluorescente verde ( <i>Green Fluorescence Protein</i> )
Hepes	Ácido(4-(2-hidroxietil)-1piperazin-etanosulfónico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IPTG	Isopropil β-D-tiogalactopiranosido
<i>mant</i> -GTP	2'(3')-O-(N-metilantraniloil)-guanosina-5'-trifosfato
MEDIO LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
Mes	Ácido 2-(N-morfolino) etanesulfónico
MIC	Concentración Mínima Inhibitoria de crecimiento bacteriano
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PC190723 (PC)	3-[(6-Cloro[1,3]tiazolo[5,4-B]piridin-2-Yl)metoxi]-2,6-difluorobenzamida
PBS	Tampón fosfato salino
PDB	Banco de Datos de Estructura de Proteínas
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano



## SUMMARY

Binary fission of many prokaryotes as well as some eukaryotic organelles depends on the FtsZ protein, the most conserved bacterial cell division protein (Margolin, 2005). FtsZ shares structural homology with the eukaryotic protein tubulin. FtsZ polymerizes at the future division site to form a ring-like structure, called the Z-ring that serves as a scaffold to recruit all other division proteins (Xiao and Goley, 2016). Numerous inhibitors of FtsZ have been described recently (Schaffner-Barbero *et al.*, 2012), and for many of them the binding region in the protein still remains unclear. To date, only two small molecule binding sites in the protein have been identified: the binding site of PC190723, a validated FtsZ inhibitor (derived from 3-methoxybenzamide) that binds between the N- and C-terminal domains of FtsZ (Haydon *et al.*, 2008); and the nucleotide (GTP) binding site at the top end of the FtsZ monomer, with the complete GTPase site formed by the N-domain of one monomer and the C-domain of the next monomer in the protofilament (Oliva *et al.*, 2004). Derivatives of GTP with substitutions in carbon 8 have also been reported as potent inhibitors ( $K_{d_{\text{MorphGTP}}} = 0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) that compete with GTP for its binding site in the protein (Lappchen *et al.*, 2008; Marcelo *et al.*, 2013). The natural compound crysphaentin (Plaza *et al.*, 2010) and hemicrysphaentin (Keffer *et al.*, 2013) have also shown affinity for the GTP binding site in FtsZ. Recently, studies in our laboratory have demonstrated that small synthetic inhibitors with different chemical structure to GTP can compete with the natural ligand for its binding to FtsZ ( $K_{d_{\text{UCM44}}} = 0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , MIC: 25  $\mu\text{M}$  in *B. subtilis*, 22  $\mu\text{M}$  in *S. aureus* MRSA;  $K_{d_{\text{UCM53}}} = 0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , MIC: 13  $\mu\text{M}$  in *B. subtilis*, 4.7  $\mu\text{M}$  in *S. aureus* MRSA) (Ruiz-Avila *et al.*, 2013). These compounds share a general structure of two gallate subunits bound to a central core of 1,3-naphthalene by ester groups. Based on this first approach, we have synthesized new compounds with a 3,5-biphenyl scaffold instead the naphthalene group as a central core; this modification improves the affinity ( $K_{d_{\text{UCM81}}} = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) and antibacterial activity (MIC UCM81: 5  $\mu\text{M}$  in *B. subtilis*, and 7  $\mu\text{M}$  in *S. aureus* MRSA) (Artola *et al.*, 2015). This Thesis has also been focused on the identification and study of new small molecules coming from a GTP site-based virtual screening, employing commercial libraries in the ICM database (Totrov y Abagyan, 1997). We found a compound (VS2.18) that binds to the nucleotide site of *Bacillus subtilis* FtsZ with an affinity of  $104 \pm 38 \mu\text{M}$  and modulates its polymerization. Based on this compound we conducted a ligand-based search that let us found new compounds (VS2.25, VS2.33) with improved affinity for the GTP binding site (2.5 – 10  $\mu\text{M}$ ); and also inhibit *B. subtilis* cell division and growth. These compounds

produced mislocalization of the FtsZ in the bacterial cells, and this effect was correlated with a phenotypic profile of filamented cells, which become unable to divide. They show MIC values in *B. subtilis* around 20 – 50  $\mu$ M, and their antibacterial activity has been confirmed in *S. aureus* MRSA. These compounds are a starting point of a multidisciplinary program of biochemistry, chemical biology and computational analysis in order to provide a structure-activity relationship to understand the mechanisms of action of these inhibitors that could help to develop new antibacterial agents.

## BIBLIOGRAPHY

- Artola, M., Ruiz-Avila, L. B., Vergonos, A., Huecas, S., Araujo-Bazan, L., Martin-Fontecha, M., Lopez-Rodriguez, M. L. (2015). Effective GTP-replacing FtsZ inhibitors and antibacterial mechanism of action. *ACS Chem Biol*, 10(3), 834-843.
- Haydon, D. J., Stokes, N. R., Ure, R., Galbraith, G., Bennett, J. M., Brown, D. R., Czaplewski, L. G. (2008). An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science*, 321(5896), 1673-1675.
- Keffer, J. L., Huecas, S., Hammill, J. T., Wipf, P., Andreu, J. M., & Bewley, C. A. (2013). Chrysopaentins are competitive inhibitors of FtsZ and inhibit Z-ring formation in live bacteria. *Bioorg Med Chem*, 21(18), 5673-5678.
- Lappchen, T., Pinas, V. A., Hartog, A. F., Koomen, G. J., Schaffner-Barbero, C., Andreu, J. M., den Blaauwen, T. (2008). Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem Biol*, 15(2), 189-199.
- Marcelo, F., Huecas, S., Ruiz-Avila, L. B., Canada, F. J., Perona, A., Poveda, A., Andreu, J. M. (2013). Interactions of bacterial cell division protein FtsZ with C8-substituted guanine nucleotide inhibitors. A combined NMR, biochemical and molecular modeling perspective. *J Am Chem Soc*, 135(44), 16418-16428.
- Margolin, W. (2005). FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 862-871.
- Oliva, M. A., Cordell, S. C., & Lowe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol*, 11(12), 1243-1250.
- Plaza, A., Keffer, J. L., Bifulco, G., Lloyd, J. R., & Bewley, C. A. (2010). Chrysopaentins A-H, antibacterial bisdiarylbutene macrocycles that inhibit the bacterial cell division protein FtsZ. *J Am Chem Soc*, 132(26), 9069-9077.
- Ruiz-Avila, L. B., Huecas, S., Artola, M., Vergonos, A., Ramirez-Aportela, E., Cercenado, E., Andreu, J. M. (2013). Synthetic inhibitors of bacterial cell division targeting the GTP-binding site of FtsZ. *ACS Chem Biol*, 8(9), 2072-2083.
- Schaffner-Barbero, C., Martin-Fontecha, M., Chacon, P., & Andreu, J. M. (2012). Targeting the assembly of bacterial cell division protein FtsZ with small molecules. *ACS Chem Biol*, 7(2), 269-277.
- Totrov, M., & Abagyan, R. (1997). Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates. *Proteins, Suppl 1*, 215-220.
- Xiao, J., & Goley, E. D. (2016). Redefining the roles of the FtsZ-ring in bacterial cytokinesis. *Curr Opin Microbiol*, 34, 90-96.

# I. INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### I.1 El divisoma y el citoesqueleto bacteriano

A lo largo de la evolución, los organismos vivos han desarrollado mecanismos efectivos para dividirse y transmitir su información genética a la progenie. En las células bacterianas, la habilidad para dividirse es fundamental y está orquestada por una maquinaria molecular compleja y dinámica, conocida como divisoma. Entender la arquitectura del divisoma es esencial para comprender sus mecanismos funcionales, hecho que facilitaría también el diseño de antibióticos y moléculas que frenen la propagación bacteriana (Söderström y Daley, 2017). En las células el proceso de división (citoquinesis), está mediado por diferentes filamentos proteicos constituidos por proteínas citomotrices con un ensamblaje dinámico (Löwe y Amos, 2009). En la mayoría de células bacterianas este proceso se da en forma de fisión binaria o septación, puesto que la célula se divide en dos compartimentos aproximadamente iguales, que son separados por un septo al finalizar el proceso, con una copia idéntica de ADN en cada una de las células hijas (Luthkenhaus, 2009). Las células procariotas, al contrario de lo que se creía hace pocas décadas, poseen un alto grado de organización. De forma análoga a lo que sucede en las células eucariotas, el interior de las células procariotas necesita reorganizarse continuamente a fin de permitir a la célula llevar a cabo tanto ciclos de reproducción como una amplia variedad de funciones sin sufrir contratiempos (Aylett *et al.*, 2011). En esta organización participan proteínas estructuralmente homólogas a elementos del citoesqueleto celular eucariota que se descubrieron con anterioridad. Estas proteínas se han clasificado en tres grupos según su papel funcional y su similitud con las proteínas que forman los tres grandes elementos del citoesqueleto en eucariotas: microtúbulos formados por tubulina, microfilamentos de actina y filamentos intermedios. Las proteínas MreB (van den Ent *et al.*, 2001), ParM (van den Ent *et al.*, 2002) y FtsA (van den Ent y Löwe, 2000), entre otras, son homólogas estructurales de actina. CreS (Ausmees *et al.*, 2003), de la familia de los filamentos intermedios, es la proteína responsable de la forma asimétrica de algunas bacterias, como por ejemplo la curvatura de las células de *C. crescentus*. La proteína de división celular bacteriana FtsZ (Löwe y Amos, 1998) y las proteínas BtubA/B (Jenkins *et al.*, 2002; Schlieper *et al.*, 2005) del género *Prosthecobacter*, son homólogas estructurales de la tubulina eucariota (Nogales *et al.*,

1998b). BtubA y BtubB, se consideran tubulinas primitivas transferidas horizontalmente de células eucariotas (Martin-Galiano *et al.*, 2011). También la proteína TubZ ha sido descrita como una homóloga de la tubulina que forma parte del sistema de partición en plásmidos y fagos (Larsen *et al.*, 2007; Chen y Erickson, 2008; Oliva *et al.*, 2012; Kraemer *et al.*, 2012; Chaikerasitak *et al.*, 2017). No obstante, también se conocen otras proteínas que son exclusivas del citoesqueleto bacteriano y no tienen homólogos eucariotas, tales como las proteínas MinD (que forma parte del sistema de regulación espacial de la división) y ParA (que forma parte del sistema de segregación cromosómica en *C. crescentus*) y ambas forman polímeros helicoidales *in vivo* (Shih *et al.*, 2003; Ebersbach y Gerdes, 2004). También se ha descrito que el factor de elongación EF-Tu (Beck, 1979; Mayer, 2003) ha sido descrito como responsable de la formación de fibras citoesqueléticas en las bacterias de vida libre del género *Spiroplasma*, que carecen del sáculo de mureína para definir su forma celular.

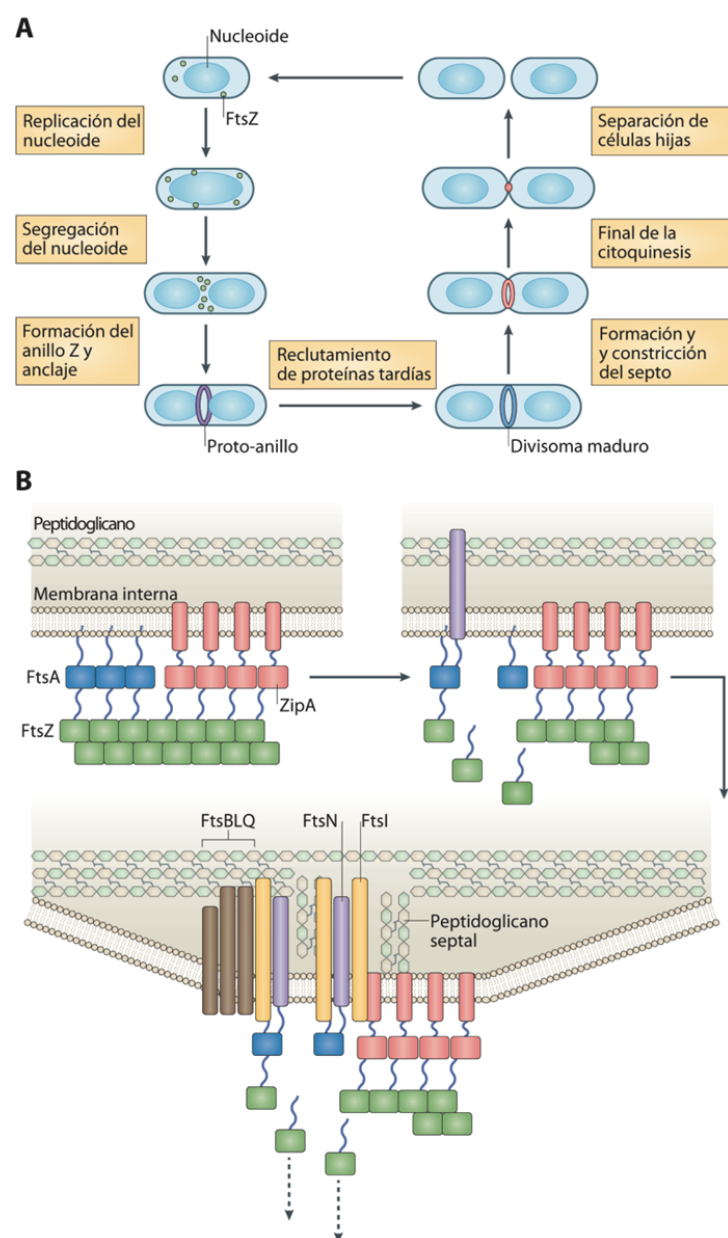
FtsZ es una proteína del citoesqueleto bacteriano esencial en la maquinaria de división celular, de aproximadamente 40 KDa. Es una homóloga estructural de la tubulina eucariota, por presentar un plegamiento similar (Lowe y Amos, 1998) aunque entre FtsZ y tubulina sólo existe una identidad del 15-20 % en su secuencia de aminoácidos (Nogales *et al.*, 1998a, Nogales *et al.*, 1998b). FtsZ y tubulina comparten ciertas características notables, incluyendo su actividad GTPasa asociada al mecanismo de ensamblaje formando polímeros (Nogales *et al.*, 1998a, Nogales *et al.*, 1998b). FtsZ también está presente en cloroplastos (por ejemplo, en plantas del género *Arabidopsis thaliana*) y en algunas mitocondrias de eucariotas primitivos (Margolin, 2005), respaldando este hecho la teoría de que FtsZ y tubulina comparten un origen ancestral común. FtsZ se encuentra presente incluso en el género *Mycoplasma*, que engloba a distintas especies bacterianas que carecen de pared celular. No obstante, aunque son casos aislados, existen procariotas que viven sin FtsZ como la familia de las crenarqueotas, que disponen de las proteínas Cdv que sustituyen la función de FtsZ (Lindas *et al.*, 2008). Se ha visto que sólo algunas bacterias, parásitos o simbioses intracelulares de la familia *Chlamydiaceae* y *Ureaplasma urealyticum* carecen de homólogos de FtsZ (Brown y Rockey 2000; Glass *et al.*, 2000; Read *et al.*, 2000).

Existen diferencias significativas entre tubulina y FtsZ. En tubulina, la unidad funcional es un heterodímero, constituido por las subunidades  $\alpha$ - y  $\beta$ - tubulina, que ensambla formando estructuras dinámicas conocidas como microtúbulos, compuestos por la asociación lateral de



13 protofilamentos que forman una estructura tubular y que, además de formar el huso mitótico, juegan un rol muy importante en el movimiento celular y en el transporte de orgánulos en el interior de la célula eucariota. En FtsZ, el monómero es la unidad funcional, y cuando el GTP se une al bolsillo catalítico, ensambla formando protofilamentos monocatenarios en una disposición cabeza-cola. En la célula, estos protofilamentos interaccionan lateralmente para formar el anillo Z, que funciona como andamio para el ensamblaje del divisoma (Lutkenhaus, 2009) guiando la síntesis, localización y forma del septo de división (Adams y Errington, 2009). Mediante microscopía electrónica (EM) y marcaje inmunológico con partículas oro, Bi y Lutkenhaus identificaron por primera vez, en 1991, el anillo Z en la zona de división en células de *Escherichia coli*, lo que supuso un cambio de paradigma en el campo de la división celular bacteriana (Bi y Lutkenhaus, 1991).

La división celular bacteriana ha sido ampliamente estudiada tanto en la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis* como en la Gram-negativa *Escherichia coli*, y ambos organismos comparten elementos básicos de la maquinaria de división celular, aunque existen diferencias entre ambos sistemas (Errington, 2003). En *E. coli*, la estructuración del divisoma se ha visto que no está tan jerarquizada como se pensaba en un inicio, pero sí se forman complejos de proteínas "tempranas" que se agrupan previamente para reclutar otras proteínas de división "tardías" (Schmidt *et al.*, 2004; Goehring y Beckwith, 2005). Esta asociación es mucho más dinámica en *B. subtilis* y *Streptococcus pneumoniae*, pues proteínas consideradas "tardías" (FtsN, FtsK, FtsBLQ, FtsW y FtsI) pueden contribuir a captar proteínas consideradas "tempranas" (FtsZ, FtsA, ZipA, EzrA y las proteínas *Zaps*) (Morlot *et al.*, 2003; Goehring *et al.*, 2006). Estudios de interacción proteína-proteína han revelado un alto nivel de interconectividad entre proteínas del divisoma (Egan y Vollmer, 2013). Se conocen muchas proteínas que interaccionan directamente con FtsZ, muchas de ellas con roles análogos a los que ejercen las MAPs (*microtubule-associated proteins*) en eucariotas (aunque no comparten homología con estas) y que afectan al ensamblaje, organización y estabilidad del anillo Z (Adams y Errington, 2009). Algunas de las proteínas más relevantes en el proceso de división se describen a continuación, junto con su función en la división celular bacteriana (**Figura 1**).



**Figura 1. Ciclo de citokinesis bacteriana y organización del divisoma. A.** Modelo del ciclo de división y formación del anillo Z en *Escherichia coli*. FtsZ se concentra en el centro de la célula, junto con ZipA y FtsA, después de la replicación celular y segregación del nucleóide, anclando FtsZ a la membrana, y dando lugar a la formación del proto-anillo. A continuación, se lleva a cabo la maduración del divisoma, orquestado por las proteínas de división tardías (FtsN, FtsK, FtsBLQ, FtsW y FtsI), que coordinan la constricción de la membrana interna y externa, dando lugar a las invaginaciones de membrana que forman el septo. Por último se produce la separación de la célula en dos células hijas de igual tamaño. **B.** Los protofilamentos de FtsZ son anclados a la membrana mediante ZipA, con su extremo flexible y su fragmento transmembrana, y mediante FtsA, a través de su hélice anfipática. FtsA recluta a FtsN que, a su vez, recluta a FtsI, encargada de la síntesis del peptidoglicano septal. Estas proteínas, junto con el complejo FtsBLQ, transmiten las señales del periplasma al anillo Z a través de FtsA, que coordina la constricción del anillo Z con la síntesis del peptidoglicano septal, el recambio de subunidades de FtsZ y la hidrólisis de la pared celular a medida que se produce la invaginación de la membrana en la región septal. (Haeusser y Margolin, 2016).

Un tercio de las proteínas que constituyen el divisoma (FtsZ, FtsA, ZipA, FtsK, FtsQ, FtsL, FtsB, FtsW, FtsI, y FtsN) son generalmente consideradas el núcleo del mismo, debido a su papel esencial en la división, y como consecuencia, en la viabilidad celular (Haeusser y Margolin, 2016). Muchas de estas proteínas, incluida FtsZ, están codificadas por genes de la familia *fts* (*filament-forming temperature sensitive*) relacionados con la división, que se descubrieron a partir del aislamiento de mutantes condicionales que filamentaban a altas temperaturas (Hirota *et al.*, 1968). El modo en que actúan muchas de estas proteínas aún se desconoce, pero se sabe que contribuyen a la segregación del nucleóide, evitan la replicación del material genético en sitios de división no adecuados, establecen el sitio de división celular y dirigen la formación de la pared y el septo de división (Harry *et al.*, 2006).

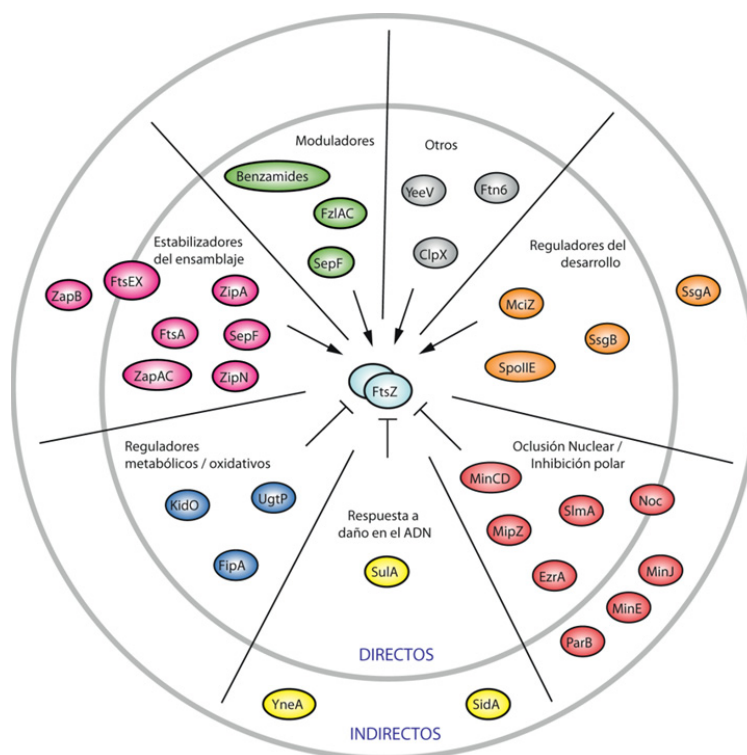
Existen distintas fases en el proceso de formación del divisoma. La primera, que marca el inicio del proceso de división en la célula, consiste en la formación del proto-anillo (Erickson *et al.*, 2010; Rico *et al.*, 2013), formado por las proteínas FtsZ, FtsA y ZipA. Las proteínas FtsA y ZipA se unen al extremo C-terminal altamente conservado de FtsZ (CTT) (Ma y Margolin, 1999). Ambas se encargan de estabilizar los polímeros de FtsZ en la membrana, una vez estos han sido posicionados en el centro de la célula. La regulación del posicionamiento de FtsZ en la célula viene mediada por los sistemas de regulación negativa Min (de las siglas en inglés para *minicell*), que previene la formación del anillo Z en los polos de la célula, y el sistema NO (de las siglas en inglés para *Nuclear Occlusion*), que evita la formación del anillo Z en las inmediaciones del nucleóide (Rothfield *et al.*, 2005; Lutkenhaus, 2007). FtsA es una proteína con actividad ATPasa, muy conservada en bacterias y homóloga a la actina eucariota (van den Ent y Löwe, 2000). En *E. coli*, se determinó que FtsA se une a la bicapa lipídica con su hélice anfipática (Hale y de Boer, 1999; Erickson 2001), anclando el anillo Z a la membrana plasmática, por lo que su función es crucial para la regulación y formación del septo (Tormo *et al.*, 1985) además de ser imprescindible para captar otras proteínas como FtsI, FtsN o FtsK al ecuador celular (Pichoff y Lutkenhaus, 2002; Rico *et al.*, 2004; Corbin *et al.*, 2004). ZipA es una proteína bitópica de membrana (Ohashi *et al.*, 2002) compuesta por un dominio transmembrana de anclaje, un dominio rico en prolina y glutaminas, y un dominio globular C-terminal (Adams y Errington, 2009). Se ancla a la membrana mediante su región amino terminal, quedando su región C-terminal expuesta en el interior del citoplasma. Con esta región, ZipA interacciona directamente con la región CTT altamente conservada de FtsZ (Liu *et al.*, 1999;

Hale *et al.*, 2000; Mosyak *et al.*, 2000). Se conocen otras proteínas no esenciales que también, en fases tempranas, regulan de forma positiva la formación del anillo Z. Un ejemplo de ello es SepF, que interactúa consigo misma para formar polímeros que se unen a la membrana y se distribuyen perpendicularmente a lo largo del eje de división, e interacciona directamente con el péptido CTT de FtsZ, del mismo modo que lo hace FtsA (Krol *et al.*, 2012), para anclar el anillo Z a la pared celular sin afectar a su actividad GTPasa (Hamoen *et al.*, 2006). También las *proteínas asociadas a Z*, o Zap (ZapA, ZapB y ZapC), son proteínas no esenciales reguladoras de FtsZ con una funcionalidad redundante con otras proteínas del divisoma.

La segunda fase en el proceso de formación del divisoma se corresponde con la asociación de proteínas "tardías" involucradas en la síntesis de la pared celular (septo), tales como FtsN, FtsK, FtsBLQ, FtsW y FtsI (en *E. coli*), que intervienen en la maduración del divisoma (Haeusser y Margolin, 2016). El ensamblaje de la compleja maquinaria del divisoma es el resultado de la asociación secuencial de varios subcomplejos constituidos por el complejo del proto-anillo (FtsZ - FtsA - ZipA - ZapA - ZapB), el complejo intermedio de la membrana (FtsK - FtsQ - FtsL - FtsB), y la maquinaria asociada a la membrana y al periplasma, que guía la síntesis y separación del peptidoglicano (FtsW - FtsI - FtsN - PBP1b - AmiC - EnvC - Tol/Pal) (Karimova *et al.*, 2009). Se cree que las proteínas "tardías" son captadas cuando se produce la invaginación inicial de la membrana celular por el proto-anillo, que actúa como un marcador topológico temporal. Sin embargo, algunas de estas proteínas son a la vez promotoras del ensamblaje de FtsZ, concentran FtsZ en la membrana, entrecruzan protofilamentos separados o facilitan la interacción lateral entre polímeros (Gueiros-Filho y Losick, 2002; Monahan *et al.*, 2009; Dajkovic *et al.*, 2010; Hale *et al.*, 2011). El proceso de citocinesis finaliza con la segregación de los nucleoides (Inoue *et al.*, 2009), la constricción de la membrana citoplasmática en coordinación con la síntesis de peptidoglicano en el septo de división y, en bacterias Gram-negativas, la invaginación de la membrana externa.

Estudios recientes de recuperación de fluorescencia después de fotoblanqueo (FRAP) indican que FtsZ desensambla por completo antes de que se complete el proceso de constricción (Söderström *et al.*, 2014). En el desensamblaje de FtsZ intervienen proteínas desestabilizadoras de los polímeros de FtsZ, contrarrestando los mecanismos citados anteriormente y actuando de forma antagónica a los estabilizadores de la polimerización: secuestrando monómeros de FtsZ o inhibiendo las interacciones laterales entre

protofilamentos (Adams y Errington, 2009). Las proteínas más relevantes que participan en la regulación de FtsZ se han esquematizado en la **Figura 2**.



**Figura 2.** Esquema de las principales proteínas y moléculas pequeñas que interaccionan con FtsZ, directa o indirectamente, en el proceso de formación del divisoma. Se han clasificado según su mecanismo de acción (Kirkpatrick y Viollier, 2011).

Existen otras proteínas bacterianas con una función de regulación negativa del ensamblaje de FtsZ. En bacterias Gram-negativas, SulA es una proteína que actúa como un potente inhibidor de FtsZ en el caso que se produzca daño en el ADN, como parte del sistema de respuesta SOS (Huisman *et al.*, 1984). SulA interacciona con la base del subdominio globular C-terminal de FtsZ, bloqueando el bucle catalítico, lo que lleva rápidamente al desensamblaje del anillo Z (Cordell *et al.*, 2003; Dajkovic *et al.*, 2008b), impidiendo el ensamblaje de anillos Z nacientes o incluso aquellos que están en constricción activa (Justice *et al.*, 2000). En *B. subtilis* y en *Corynebacterium glutamicum* se han encontrado las proteínas YneA y DivS (respectivamente) que, a pesar de no ser homólogos estructurales de SulA, también se han identificado como

responsables del secuestro de FtsZ en respuesta al sistema SOS (Kawai *et al.*, 2003; Ogino *et al.*, 2008).

La proteína EzrA es un inhibidor del ensamblaje del anillo Z que regula la formación de un único anillo en el centro de la célula por cada ciclo de división (Chung *et al.*, 2007). Otra proteína similar a EzrA es ClpX, una chaperona muy conservada en bacterias.

UgtP es una transferasa que inhibe la polimerización de FtsZ y se expresa en situaciones en las que existe una alta disponibilidad de nutrientes. Su mecanismo de acción consiste en la disrupción de las interacciones laterales entre protofilamentos de FtsZ (Weart *et al.*, 2007) con el objetivo de retrasar la división de la célula en situaciones de alta disponibilidad de nutrientes, para favorecer que la célula alcance un mayor tamaño antes de la división. En *E. coli* no se conocen homólogas de esta proteína, pero se cree que pueden existir mecanismos similares (Weart *et al.*, 2007). El péptido MciZ (Mother Cell Inhibitor of FtsZ), de 40 aminoácidos, inhibe la formación del anillo Z en situaciones de esporulación, cuando se expresa en el compartimento de la célula madre de *B. subtilis* adyacente al compartimento pre-espora (Handler *et al.*, 2008). Actúa en los monómeros de FtsZ, inhibiendo el ensamblaje en fases iniciales de polimerización, y su papel en células en estado vegetativo es crucial para prevenir el ensamblaje de anillos Z (Handler *et al.*, 2008). La estructura de rayos X del complejo BsFtsZ-MciZ ha revelado que este péptido se une a una región del subdominio globular C-terminal cercana a la interfaz de polimerización de FtsZ, equivalente al extremo negativo de tubulina (Bisson-Filho *et al.*, 2015). El modo de unión a FtsZ se detalla más adelante en el apartado **Inhibidores de FtsZ**.

Es importante remarcar que existen otros reguladores negativos de la polimerización de FtsZ en otros sistemas bacterianos. Algunos de ellos son: KidO (Radhakrishnan *et al.*, 2010) en *C. crescentus*, el sistema de oscilación circadiano KaiABC (Dong *et al.*, 2016) en *Synechococcus elongatus*, Maf (Briley *et al.*, 2011) en *B. subtilis*, OpgH (Hill *et al.*, 2013) en *E. coli*, e incluso recientemente se ha caracterizado (a pesar de que fue identificado hace más de 20 años) el regulador sARN DicF, un pequeño ARN no codificante que actúa silenciando la expresión de FtsZ. Este ARN es codificado por un gen defectivo (Qin), originario de un pro-fago, que ha pasado a formar parte del genoma de muchas cepas de *E. coli*, mediante transferencia horizontal (Balasubramanian *et al.*, 2016).

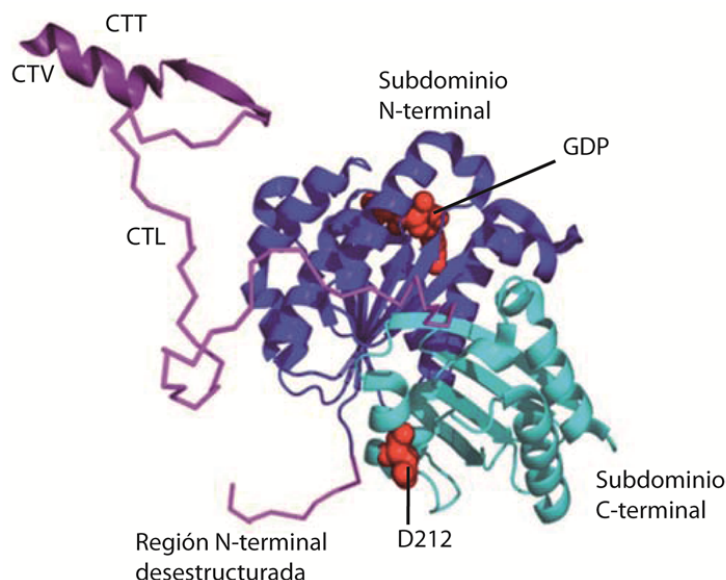
## I.2 Estructura y función de FtsZ

A pesar de la limitada identidad de secuencia entre tubulina y FtsZ, la similitud estructural entre subunidades monoméricas y entre filamentos, así como en el mecanismo GTPasa de ambas proteínas, hace que sean consideradas como proteínas formadoras de filamentos con una relación evolutiva cercana (Michie y Löwe, 2006).

En el monómero de FtsZ se pueden distinguir tres regiones que se detallan a continuación (**Figura 3**): **1)** Una región, en el extremo N-terminal, de unos 11 aminoácidos, desestructurada y poco conservada entre especies. **2)** Un núcleo globular altamente conservado dividido en dos subdominios amino- y carboxilo- terminal que quedan conectados mediante la hélice central H7. El subdominio N-terminal presenta un plegamiento tipo Rossman, con una lámina  $\beta$  formada por seis segmentos  $\beta$  paralelos, rodeados por hélices  $\alpha$  unidas por bucles que constituyen el sitio de unión del nucleótido, GTP, responsable del ensamblaje y desensamblaje de la proteína. El subdominio C-terminal contiene el bucle catalítico T7, donde se encuentran los residuos implicados en la hidrólisis del GTP. **3)** Un extremo C-terminal que presenta a su vez una región desestructurada (CTL) (Sundararajan *et al.*, 2015) que une el núcleo globular con un péptido corto altamente conservado (CTT), necesario para la unión de FtsZ a FtsA, y a otras proteínas del divisoma (Ma y Margolin, 1999; Erickson, 2001; Vaughan *et al.* 2004; Gardner *et al.*, 2013; Buske y Levin, 2013). A continuación hay una pequeña región de aminoácidos variables (CTV) (Lowe y Amos, 1998; Vaughan *et al.*, 2004; Margolin, 2005), que es necesaria para establecer las interacciones laterales entre protofilamentos de FtsZ en ausencia de proteínas moduladoras. Se ha visto que cambios en esta región afectan *in vivo* a la estabilidad del anillo Z (Buske y Levin, 2012).

El bolsillo de unión de nucleótido en FtsZ es la región que comparte mayor homología estructural con tubulina (Löwe, 1998; Nogales *et al.*, 1998a). En ambas es necesaria la polimerización de la proteína para que se forme la interfaz catalítica en esta región. Cuando se une el GTP, se produce el ensamblaje de FtsZ posicionándose el bucle T7 del subdominio C-terminal de la subunidad de arriba próximo al sitio de unión del GTP de la subunidad de abajo (Lowe y Amos, 1998). Por tanto, la actividad GTPasa de la proteína depende de la

polimerización de FtsZ, de forma que la hidrólisis del GTP inducirá el desensamblaje del polímero (Scheffers *et al.*, 2001; Scheffers y Driessen, 2002; Oliva *et al.*, 2004).



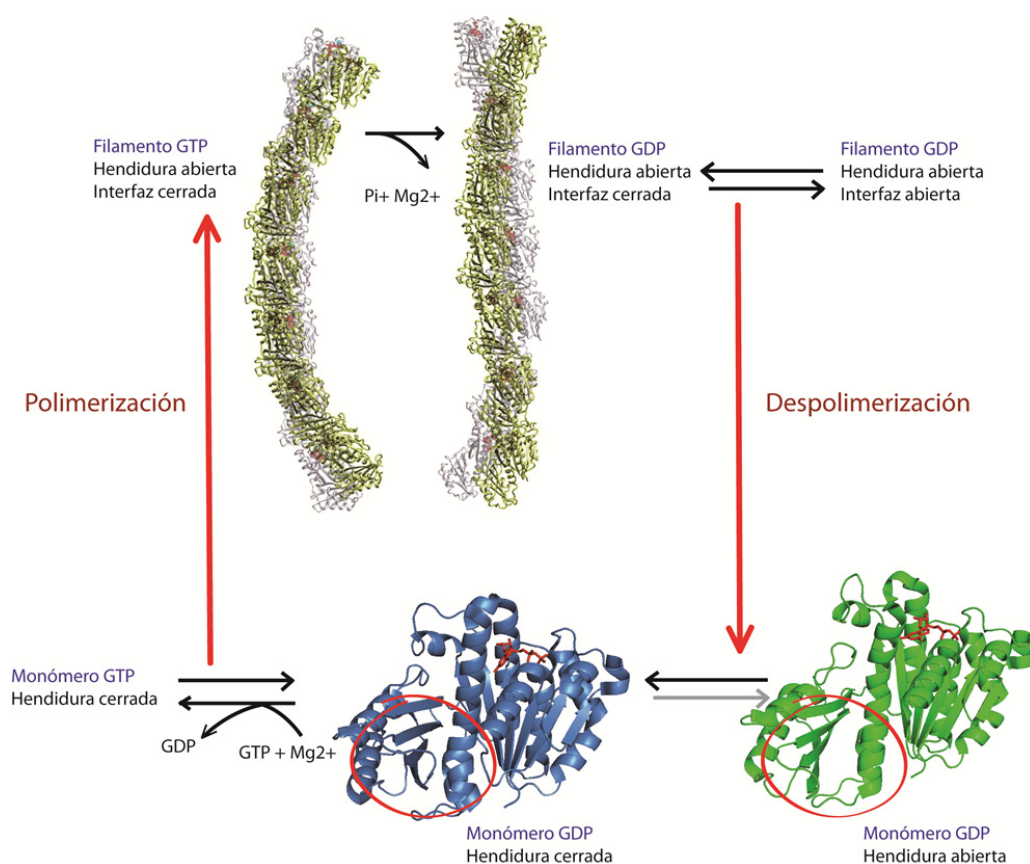
**Figura 3. Estructura del monómero de FtsZ de *P. aeruginosa*.** Se muestra el dominio globular compuesto por los subdominios N-terminal (azul) y C-terminal (cian). En morado se muestra la región C-terminal que presenta una región desestructurada (CTL) que conecta las regiones CTT y CTV con el dominio globular, y la región desestructurada de 11 aminoácidos del extremo N-terminal. En rojo se muestra el GDP y el aspártico (D212 en FtsZ de *E. coli*) del bucle catalítico (I7). (Gardner *et al.*, 2013)

En el ensamblaje y en la hidrólisis del nucleótido, interviene también un ión magnesio ( $Mg^{2+}$ ) coordinado con los fosfatos  $\beta$  y  $\gamma$  del GTP (Löwe y Amos, 1998). El  $Mg^{2+}$  es esencial, junto con el GTP, para la polimerización y dinamicidad del proceso (Mukherjee y Lutkenhaus, 1999). El GDP carece del fosfato- $\gamma$ , por lo que desestabiliza la estructura del filamento produciendo el desensamblaje de los polímeros (Huecas y Andreu, 2003; Huecas y Andreu, 2004). En presencia de  $Mg^{2+}$  y de GTP, el ensamblaje *in vitro* de FtsZ produce formas poliméricas que van desde filamentos sencillos hasta manojos, anillos, hélices, estructuras tubulares o láminas, dependiendo de las condiciones experimentales empleadas (Mukherjee y Lutkenhaus, 1994; Bramhill y Thompson, 1994; Chen y Erickson, 2005).

FtsZ polimeriza de forma cooperativa formando filamentos sencillos, de una sola subunidad de grosor. En 2008 se propuso que la cooperatividad se podría explicar si la proteína sufriera un cambio conformacional al pasar del estado monomérico al polímero



postulándose así la existencia de dos estados conformacionales. Se postuló que uno de los estados del monómero era inactivo, con baja afinidad para iniciar la polimerización, y otro era activo, con alta afinidad para polimerizar (Huecas *et al.*, 2008; Dajkovic *et al.*, 2008; Miraldi *et al.*, 2008). No obstante, todas las estructuras cristalográficas de FtsZ resueltas hasta ese momento mostraban la misma conformación, independientemente del nucleótido que llevaran unido, GTP, GDP, GTP $\gamma$ S o incluso la forma apoFtsZ. Cuando se resolvió la estructura cristalográfica de SaFtsZ, se vio que formaba un filamento recto que estaba constituido por monómeros que presentaban una hendidura abierta entre el subdominio C-terminal y la hélice H7, con el dominio de activación GTPasa de la región C-terminal rotado y desplazado (aproximadamente 27°) (Matsui *et al.*, 2012; Elsen *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012;). Esta conformación abierta respaldaría la teoría de que FtsZ actúa como un interruptor molecular regulado para la polimerización (Martin-Galiano *et al.*, 2010; Chen y Erickson, 2011).

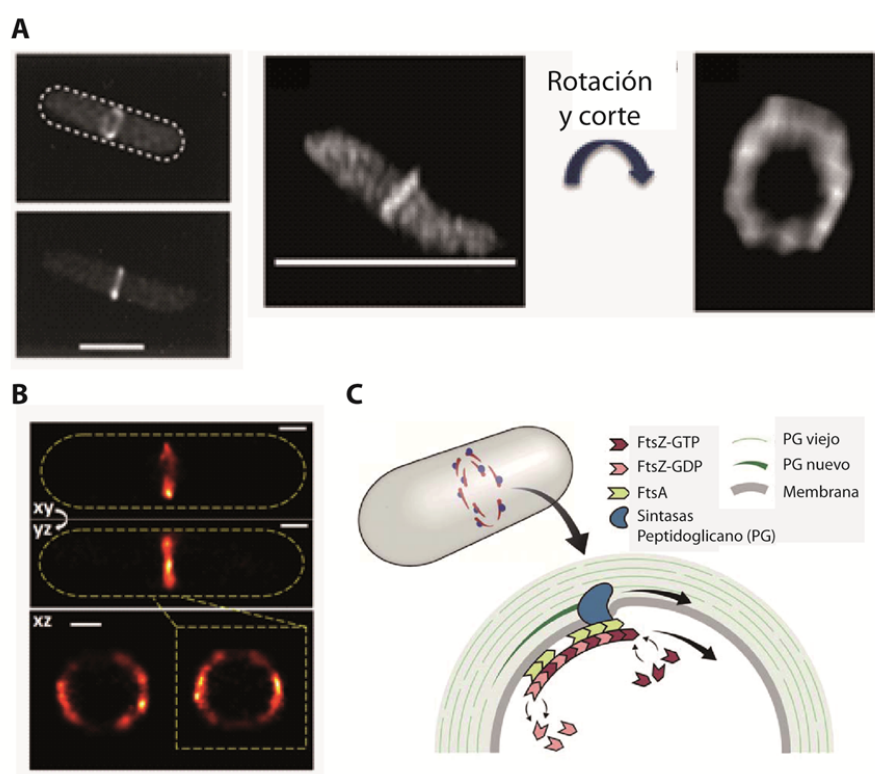


**Figura 4.** Esquema del ciclo de ensamblaje-desensamblaje de FtsZ que integra la dinámica del filamento dependiente de nucleótido con el interruptor de ensamblaje. Detalles en el texto. (Figura modificada de Ramírez-Aportela *et al.*, 2014).

Más recientemente, se ha realizado un estudio de dinámica molecular de un filamento constituido por 7 monómeros con la estructura de SaFtsZ en su conformación abierta (**Figura 4**). En esta disposición, el polímero estaría en un estado funcional pues se favorece la formación de una interfaz estrecha entre los monómeros del filamento, encerrando el nucleótido (Ramírez-Aportela *et al.*, 2014). En este estudio se predice un movimiento en la interfaz entre monómeros que da lugar a filamentos rígidos, con GTP o con GDP + PC190723 (descrito más adelante en el apartado **Inhibidores de FtsZ**) o bien relajados (con GDP), influyendo esta fluctuación en la dinamicidad del filamento. Según estas simulaciones, el filamento de FtsZ con GTP se mantiene ligeramente curvado y rígido, con la hendidura entre dominios abierta y la interfaz entre monómeros cerrada. En el modelo con GDP, se observa un filamento que fluctúa y muestra una transición de la interfaz entre monómeros entre un estado abierto y cerrado, con la hendidura siempre abierta. Según el ciclo de ensamblaje propuesto, el filamento de GDP despolimerizaría dando lugar a monómeros con GDP que se mantienen en un estado transitorio con la hendidura abierta o cerrada. El GDP unido rápidamente se intercambiaría con GTP, dando lugar a monómeros con la hendidura cerrada que pueden volver a polimerizar. Se ha visto, además, que en el filamento, PC190723 puede unirse en la hendidura abierta, lo que explica el efecto estabilizante que ejerce este ligando en el ensamblaje de FtsZ, bloqueando el mecanismo de interruptor molecular de la proteína. Según parece, esto confirmaría lo que se había postulado anteriormente: que este cambio conformacional se produciría por un movimiento de apertura y cierre de la hendidura que provocaría un cambio en la asociación axial entre monómeros en el filamento de FtsZ (Martin-Galiano *et al.*, 2010). Este cambio conformacional se ha comprobado en solución mediante ensayos con una sonda fluorescente, UCM01, basada en la estructura de PC190723 y desarrollada en el laboratorio. Estos ensayos se han realizado tanto con SaFtsZ como con BsFtsZ, y se ha visto que, en ambos casos, la sonda UCM01 sólo se une a la hendidura abierta en el filamento (Artola *et al.*, 2015). En el monómero, dada la transición entre la conformación abierta y cerrada, la sonda no es capaz de unirse a la hendidura.

La arquitectura del anillo Z *in vivo* se desconoce, aunque se cree que se compone de filamentos solapados a lo largo de la circunferencia del anillo, al menos durante las últimas fases del proceso de división en organismos bacilares como *E. coli* (Szwedziak *et al.*, 2014). Investigaciones con crio-tomografía electrónica de células de *C. crescentus* sugieren que puede

consistir en protofilamentos cortos solapados formando haces de una sola capa (5 - 15 filamentos de ancho). En el caso de *E. coli* estos filamentos se establecen a una distancia de  $150 \pm 2$  nm por debajo de la membrana (Szwedziak *et al.*, 2014). Mediante experimentos de microscopía de fluorescencia de alta resolución se ha visto que el anillo Z es discontinuo (**Figura 5A**) formado por agrupaciones relativamente pequeñas de filamentos de FtsZ (Strauss *et al.*, 2012; Buss *et al.*, 2013; Holden *et al.*, 2014; Rowlett y Margolin, 2014; Coltharp *et al.*, 2016). También mediante experimentos de 3D PALM han confirmado la formación de un anillo Z discontinuo (**Figura 5B**) en el eje de división (Lyu *et al.*, 2016).



**Figura 5. Anillo Z. A. Imágenes obtenidas mediante 3D-SIM.** Se muestra el anillo Z en células de *B. subtilis* (SU570). Puede apreciarse una banda transversa de fluorescencia. Se muestra también la proyección en el plano x-y donde puede apreciarse la composición heterogénea del anillo Z. El diámetro del anillo Z es de 0.8  $\mu$ m. Barra de escala: 200nm (Strauss *et al.*, 2012). **B. Imágenes Obtenidas mediante 3D-PALM** Se muestra la proyección en 2 dimensiones en el plano x-y del anillo Z de una célula de *E. coli* BW25113 que expresa FtsZwt-mEos3.2. Barra de escala: 200nm (Lyu *et al.*, 2016). **C. Modelo propuesto de la división celular por *treadmilling* de FtsZ.** Esquema del anillo Z compuesto por filamentos cortos solapados de FtsZ y FtsA (en rojo) deslizándose a lo largo del plano de división y desplazando consigo las sintetas de peptidoglicano (PG) asociadas (azul). Estas encimas sintetizan la nueva pared celular a lo largo del plano de división (Bisson-Filho *et al.*, 2016).

Experimentos *in vitro* apuntan que la polimerización de FtsZ produce filamentos con una longitud de hasta 30 subunidades (de unos 120 nm), cuyo tamaño es insuficiente para rodear toda la célula (Erickson, 2009). El anillo Z desensambla al finalizar la división, y está en constante remodelado, presentando una dinámica rápida de sustitución de los monómeros que constituyen los protofilamentos de FtsZ, con un recambio de subunidades de entre 8 y 30 segundos de media (Anderson *et al.*, 2004).

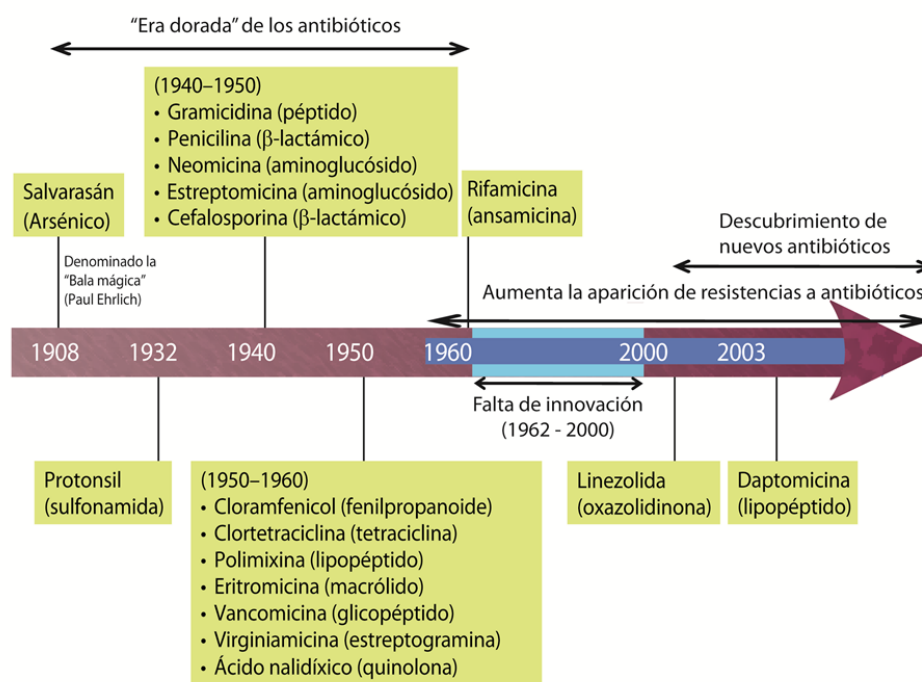
Hasta la fecha, se han propuesto varios modelos en los que se intenta explicar cómo FtsZ produce (o no) la fuerza de constricción de la membrana durante la división celular, como son el modelo de “pinzamiento iterativo”, el “modelo de andamio”, el “modelo deslizante” (*sliding*) y, más recientemente, el modelo de “*treadmilling*” (**Figura 5C**). Las evidencias experimentales y los hallazgos más recientes apuntan a éste último (“*treadmilling*”) como la explicación más plausible de la situación real que se da en la célula (Loose y Mitchison, 2014; Yang *et al.*, 2017; Bisson-Filho *et al.*, 2017). Este modelo se basa en una propiedad que tienen ciertos filamentos citomotrices cuyas subunidades tienen un comportamiento dinámico, dada la rápida hidrólisis del nucleótido en las interfaces de polimerización. Durante el “*treadmilling*”, se añaden subunidades en uno de los extremos del polímero (+) mientras que otras desensamblan en el extremo opuesto (-), lo que resulta en una translocación unidireccional del filamento (Loose y Mitchison, 2014). La velocidad neta de polimerización y despolimerización, en los denominados extremos positivos y negativos de los filamentos, es diferente, hecho que produce un movimiento de éstos en la célula en una sola dirección, con una velocidad alrededor de 20-40nm/s dependiendo de la especie bacteriana (Yang *et al.*, 2017; Bisson-Filho *et al.*, 2017). En un ensayo se reprodujeron las condiciones de polimerización de FtsZ y las interacciones entre FtsA y FtsZ en soportes con bicapas de membrana (Loose y Mitchison, 2014). Mediante el uso de la técnica de microscopía de fluorescencia de reflexión interna (TIRF), se visualizaron *in vitro* moléculas individuales de FtsZ marcadas con cianina Cy5 en un fondo de polímeros de FtsZ marcados con Alexa488. Los autores vieron que, mientras que la red de filamentos estaba en continuo movimiento y reorganización, formando bucles dinámicos a lo largo de la membrana, las moléculas individuales de FtsZ marcadas con Cy5 se mantenían en la misma posición.

Recientemente, también con técnicas de TIRF se ha podido determinar que el “*treadmilling*” de los filamentos de FtsZ asociados a FtsA, guían la síntesis del peptidoglicano de la pared del

septo, tanto en *B. subtilis* (Bisson-Filho *et al.*, 2017) como en *E. coli* (Yang *et al.*, 2017). Este comportamiento dinámico del anillo Z se ha visto que no depende de las proteínas moduladores del ensamblaje, como SulA, SlmA, MinC, ClpX, CLpP ni tampoco de las proteínas estabilizadoras del anillo Z, como MatP y el resto de las proteínas Zap, y que, en cambio, sí depende de las propiedades de polimerización intrínsecas de FtsZ, que están relacionadas con su actividad GTPasa (Yang *et al.*, 2017). Curiosamente también se ha visto que MciZ, antagonista del anillo Z, cuando es añadido a bajas concentraciones, incrementa la actividad GTPasa de FtsZ, lo que resulta en un aumento de la velocidad del "treadmilling" (Bisson-Filho *et al.*, 2017). Los autores proponen que la conjunción entre el "treadmilling" de FtsZ y la síntesis de peptidoglicano unifican los modelos de división propuestos con anterioridad, pues este movimiento produciría la curvatura de la membrana a la vez que guía la síntesis de la pared septal en una dirección, causando la invaginación del septo (Bisson-Filho *et al.*, 2017).

### I.3 Desarrollo de nuevos antibióticos

La mayoría de los antibióticos conocidos y usados a lo largo de las últimas décadas se obtuvieron durante la "era dorada" del descubrimiento de los antibacterianos, entre 1940 y 1960 (**Figura 6**), mediante cribados de aislados de actinomicetos presentes en suelos. La quimioterapia antibacteriana tiene como origen los descubrimientos anteriores realizados por científicos como Robert Koch, Louis Pasteur, o aportaciones como las de Paul Ehrlich, que habló por primera vez del concepto de "bala mágica", para referirse a la selectividad de un derivado del arsénico para matar patógenos (O'Connell *et al.*, 2013). El descubrimiento de los antibióticos supuso una revolución en el campo de la medicina. No obstante, ya en los noventa era evidente la crisis a la que se enfrentaban los antibióticos tradicionales, pues la aparición de microorganismos resistentes era mayor que la cantidad de nuevos antibióticos descubiertos (Lewis *et al.*, 2013).



**Figura 6. Esquema de la evolución de los antibióticos desde su aparición.** El tipo de antibiótico se describe entre paréntesis. De 1962 hasta 2000 se comprende un período de falta de innovación en el campo del desarrollo de nuevos antibióticos. Coincide con un aumento en la aparición de resistencias bacterianas a los antibióticos. Desde el año 2000 hasta la actualidad solo se han llegado a desarrollar con éxito las fluoroquinolonas, las oxazolidinonas (linezolid) y la daptomicina, por lo que es extremadamente necesario hallar nuevos tratamientos y/o mecanismos que frenen la aparición de bacterias multiresistentes. (Wright, 2007).

Aparentemente, la aparición de resistencias bacterianas se debe al uso continuado de un determinado agente terapéutico, y al uso extendido de los antibióticos en la población. Para tratar de solventar este problema global, la industria farmacéutica se centró en el desarrollo de nuevos análogos sintéticos, basándose en genómica, química combinatoria, enormes campañas de cribados masivos (HTS) y diseño racional. No obstante, los malos resultados obtenidos no solventaron esta crisis, y solo cuatro grandes empresas farmacéuticas siguieron con las investigaciones en este campo: AstraZeneca, Novartis, GlaxoSmithKline y Sanofi-Aventis (Cooper y Shlaes, 2011). Estos malos resultados se deben, según algunos autores al error que supuso emplear la genómica para el desarrollo de antibióticos (Coates y Hu, 2007). Puesto que en determinados casos, la actividad enzimática de un candidato no siempre correlacionará con la actividad bactericida, debido a que se dan factores que no se tienen en cuenta en un estudio genómico, como son la pobre penetrabilidad en las células que pueden presentar algunos

compuestos, o bien el hecho de que puedan ser expulsados rápidamente de las mismas. En los últimos 50 años sólo se han llegado a desarrollar tres clases de antibióticos sintéticos: las fluoroquinolonas, las oxazolidinonas (línezolida), y la daptomicina, solo el primero se trata de un antibiótico de amplio espectro. El resto de esfuerzos enfocados en la búsqueda de antibióticos fracasaron. Este hecho indica que hay una probabilidad muy baja de descubrir nuevos fármacos sin una plataforma capaz de proporcionar una selección dirigida (Lewis *et al.*, 2013).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha advertido de la gran amenaza que supone, para la salud pública mundial, la aparición de resistencias a los antibióticos, por lo que es de extrema necesidad hallar nuevos tratamientos para combatir cepas multiresistentes (Lewis *et al.*, 2013). La OMS ha publicado en sus informes que las infecciones por neumococos, estafilococos, enterococos y bacilos de la tuberculosis, son la mayor causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. Esto se debe a que muchas cepas son resistentes a la mayor parte o a la totalidad de los antimicrobianos que alguna vez fueron eficaces para combatirlos. Se ha estimado que en el mundo más de 1.4 millones de personas contraen complicaciones causadas por infecciones nosocomiales (WHO, 2014).

Es importante señalar que muchas de las infecciones hospitalarias actuales se deben a *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) (Ayliffe *et al.*, 1999). Algunas de estas cepas tienen una facilidad particular de transmisión nosocomial. Las cepas de MRSA suelen ser resistentes a varios antibióticos además de serlo a las penicilinas y a las cefalosporinas y, a veces, son sensibles sólo a vancomicina y teicoplanina (WHO, 2014). Actualmente no existe un tratamiento antibiótico efectivo contra patógenos multiresistentes, y la metodología para tratar las infecciones causadas por este tipo de microorganismos se basa en tratamientos con vancomicina, que en muchos casos no resultan efectivos. Es por ello que urge la necesidad de nuevos antibióticos capaces de combatir este tipo de infecciones, así como descubrir nuevas dianas y mecanismos de acción frente a patógenos. En ese sentido, se ha propuesto el bloqueo de la división celular como un mecanismo para impedir una proliferación descontrolada de patógenos, evitando así las septicemias letales en procesos infecciosos.

## I.4 Inhibidores de FtsZ

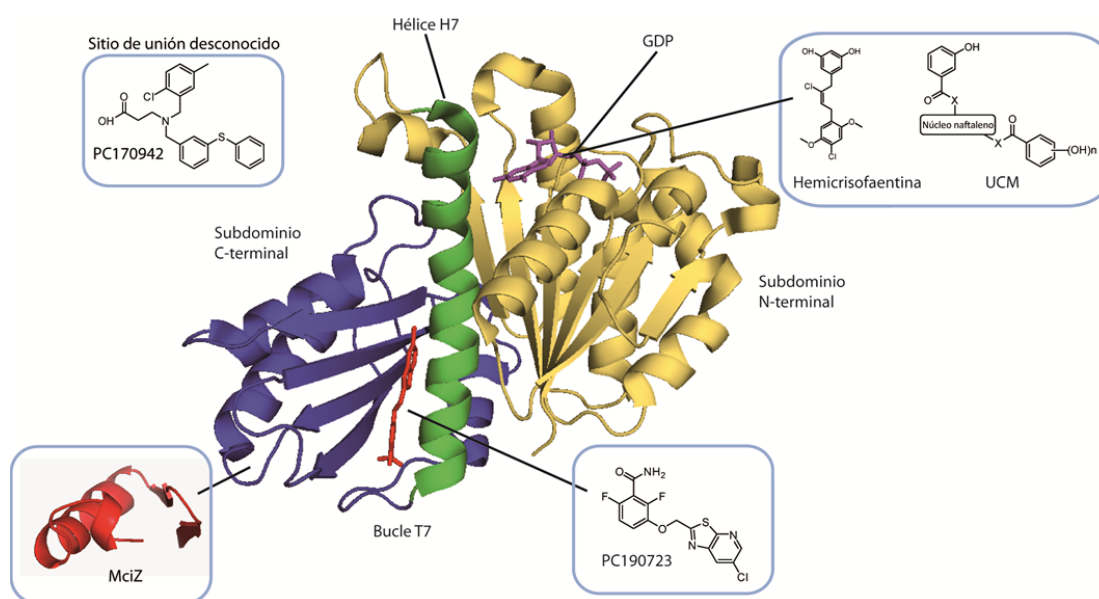
Existen varias características que hacen de FtsZ una diana emergente para el desarrollo de nuevos fármacos para combatir infecciones: 1) Es una proteína esencial y juega un rol específico en la división celular procariota (Vollmer, 2006; Lock y Harry, 2008); 2) Se encuentra muy conservada entre especies bacterianas; 3) Aunque está presente en mitocondrias de determinados linajes protistas, no se encuentra en células animales; 4) Es suficientemente distinta a tubulina para no presentar reactividad cruzada; 5) Existe un enorme trabajo de investigación en torno a FtsZ, se ha resuelto su estructura cristalográfica para varias especies bacterianas, y se conocen sus características bioquímicas y su funcionamiento biológico en células (Hurley *et al.*, 2016).

Existen en la literatura compuestos descritos cuyo mecanismo de inhibición de FtsZ ha sido estudiado con detalle. Estos compuestos de pequeño tamaño, funcionan como inhibidores de la citoquinesis bacteriana (Vollmer, 2006; Schaffner-Barbero *et al.*, 2012; Sass y Brotz-Oesterhelt, 2013), e incluso se ha descrito un inhibidor específico de FtsZ capaz de proteger contra dosis letales de *S. aureus* en modelos de infección de ratones (Haydon *et al.*, 2008). Estas pequeñas moléculas con capacidad de afectar a FtsZ se han clasificado de distintas formas. Una de estas clasificaciones se basa en su origen. En la literatura se pueden encontrar artículos que recopilan toda la información sobre los inhibidores de FtsZ conocidos. No obstante, existen muchos compuestos que han sido descritos y cuyo efecto no ha sido confirmado en posteriores estudios o bien han sido descritos más tarde como falsos positivos, como ocurrió con la Viriditoxina (Anderson *et al.*, 2012); o bien compuestos promiscuos que se unen a múltiples dianas, como ocurrió con la Berberina (Domadia *et al.*, 2008) y su derivado Berberina 2 (Sun *et al.*, 2014). Es por eso que en este apartado solo se mencionan aquellos compuestos que se han considerado los más relevantes hasta ahora descritos. Para ver una clasificación más detallada consultar Schaffner-Barbero *et al.*, 2012 y den Blaauwen *et al.*, 2014.

Uno de los inhibidores de FtsZ más efectivos descritos hasta la fecha es el compuesto PC190723, un compuesto sintético derivado de la difluoro-metoxibenzamida (Haydon *et al.*, 2008; Stokes *et al.*, 2013) (**Figura 7**). Su descubrimiento ha sido un factor clave que ha validado a FtsZ como diana para el desarrollo de fármacos, pues en modelos de infección de ratones es



capaz de proteger contra dosis letales de *S. aureus* (Haydon et al., 2008; Czaplewski *et al.*, 2009). Tal y como ha demostrado la estructura cristalográfica del complejo SaFtsZ-PC190723, este compuesto se une a un bolsillo de la proteína, hasta entonces inexplorado, que se forma en una cavidad hidrofóbica entre el dominio C-terminal, la hélice H7 y el bucle T7 (Matsui *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2012), distorsionando tanto la flexibilidad como el ensamblaje de la proteína. En la estructura cristalográfica se ha visto que la unión de la benzamida mantiene esta hendidura en una conformación abierta y esto facilita alostéricamente el ensamblaje de la proteína (Elsen *et al.*, 2012; Matsui *et al.*, 2012; Ramírez-Aportela *et al.*, 2014). Los ensayos microbiológicos con PC190723 han revelado que se trata de un inhibidor efectivo incluso en cepas MRSA, con una potente actividad antibacteriana presentando una concentración mínima inhibitoria (MIC) de 2.8  $\mu$ M. Experimentos *in vitro* han demostrado que el compuesto PC190723 disminuye la concentración crítica de ensamblaje de BsFtsZ, modula su actividad GTPasa, e induce la formación de filamentos y manojos de proteína estables (Andreu *et al.*, 2010).



**Figura 7. Estructura del monómero de FtsZ de *Staphylococcus aureus* (PDB: 3VO) con los sitios de unión de ligandos más relevantes descritos hasta la fecha.** Se muestra el nucleótido GDP (color morado) en su sitio de unión, en el subdominio N-terminal del monómero; el ligando PC190327 (color rojo), responsable de estabilizar los polímeros de FtsZ; los ligandos UCM (Ruiz-Avila *et al.*, 2013; Artola *et al.*, 2015) y la hemi-crisofoentina (Keffer *et al.*, 2013), fragmento de la crisofaentina A (Plaza *et al.*, 2010), son los compuestos más efectivos del sitio de unión del GTP; y MciZ, que es un péptido que se une a la región C-terminal en la interfaz de polimerización de FtsZ, equivalente al extremo negativo de tubulina (Bisson-Filho *et al.*, 2015). Se desconoce hasta la fecha el sitio de unión del compuesto PC170942 (Stokes *et al.*, 2005).

Se han desarrollado derivados del compuesto PC190723 mejorando sus propiedades farmacocinéticas. Algunos, como el compuesto 8J (análogo de PC190723), o el “compuesto 1” (Stokes *et al.*, 2013), presentan actividad antibacteriana, en determinadas cepas, mayor que su análogo parental. Otros derivados de PC190723, como son los compuestos TXA707 y su prodroga TXA709 (Kaul *et al.*, 2015; Lepak *et al.*, 2015), mejoran la estabilidad metabólica, las propiedades farmacocinéticas y la eficacia *in vivo* frente a *S. aureus* MRSA en modelos de infección en ratones (tanto en administración oral como intravenosa), respecto a PC190723. TXA709 es una prodroga biológicamente inactiva que puede ser metabolizada en el organismo para producir TXA707, un derivado de PC190723 capaz de inhibir a FtsZ. TXA709 ha recibido la designación QIDP (Qualified Infectious Disease Product) por el U. S. Food and Drug Administration (FDA) ([www.taxispharma.com](http://www.taxispharma.com)), y se ha descrito que, en combinación con Cefalosporina, reduce la frecuencia de aparición de *S. aureus* resistentes (Kaul *et al.*, 2016).

Otro compuesto que ha sido descrito como inhibidor de FtsZ es PC170942 (Stokes *et al.*, 2005), que se obtuvo, con el objetivo de identificar inhibidores de la división celular bacteriana, mediante un cribado basado en la activación del factor de esporulación  $\sigma^F$  en *B. subtilis*. Las mutaciones de resistencia para este inhibidor mapeaban en el sitio de unión del GTP (Stokes *et al.*, 2005). No obstante, ensayos recientes en el laboratorio demostraron que, aunque PC170942 modifica la actividad GTPasa de la proteína, no se observó unión al sitio del GTP mediante ensayos de desplazamiento del *mant*-GTP en BsFtsZ (Ruíz-Ávila *et al.*, 2013). En nuestro laboratorio se confirmó que, tal y como proponían trabajos previos (Stokes *et al.*, 2005), PC170942 es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano en *B. subtilis* 168, así como de inducir la filamentación celular, por lo que se ha especulado con la posibilidad de que este inhibidor se esté uniendo a un sitio cercano al nucleótido y que esté afectando a la interfaz de polimerización de la proteína. Sin embargo, el sitio de unión en BsFtsZ de este inhibidor todavía no ha sido determinado.

Los análogos del GTP con sustituciones en el carbono 8 (C8-derivados) también se han descrito como inhibidores de la polimerización y la actividad GTPasa de FtsZ de *E. coli* (Läppchen *et al.*, 2008). Estos análogos (BrGTP, MeOGTP, MorphGTP, PyrrGTP) son capaces de reemplazar al ligando natural en BsFtsZ y en MjFtsZ con afinidades por el sitio de unión cercanas a la que presenta el GTP (Marcelo *et al.*, 2013). La estructura cristalográfica, a 1.4 Å de resolución, del complejo de FtsZ con el C-8 derivado morfolino-GTP (MorphGTP)

reveló que la conformación de la proteína era muy similar a la del complejo FtsZ-GDP (Läppchen *et al.*, 2008). Empleando datos de RMN y de modelado molecular se pudo comprender el mecanismo por el que estos análogos de GTP C8-derivados modifican el ensamblaje de FtsZ. Su unión a FtsZ induce un remodelado electrostático y pequeños cambios estructurales en la interfaz de asociación entre monómeros en el polímero. Así MorphGTP se comporta como un análogo de GTP no hidrolizable, cuya unión a MjFtsZ induce la formación de filamentos curvos, similares a los polímeros observados con las formas inactivas de esta proteína. En el caso de BsFtsZ, se vio que la inhibición de la polimerización de BsFtsZ por el MorphGTP se da por los impedimentos estéricos que se producen entre monómeros cuando este derivado de GTP se une al sitio del nucleótido (Marcelo *et al.*, 2013).

Por otro lado, empleando tanto técnicas de RMN como ensayos bioquímicos y modelado molecular, se ha realizado un estudio reciente en el laboratorio que ha permitido caracterizar el modo de unión de la sonda fluorescente *mant*-GTP a FtsZ. Se ha visto que el grupo *mant*-fusionado a GTP interacciona fuertemente en una extensión del sitio de unión del GTP, cuya unión también se respaldó mediante simulaciones de dinámica molecular. Además, se ha demostrado que la unión de la sonda *mant*-GTP induce la polimerización de la FtsZ de arqueas en filamentos curvos inactivos, que no pueden hidrolizar el nucleótido, en lugar de producir el ensamblaje normal en polímeros rectos que sí son capaces de hidrolizar el GTP. Esta sonda también inhibe el ensamblaje normal de FtsZ de bacterias Gram-negativas como *Escherichia coli*, mientras que induce una polimerización normal y es hidrolizada por FtsZ de bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis*. El estudio de la interacción *mant*-GTP – FtsZ ha permitido conocer el modo de unión de la sonda, que puede ser utilizado para la búsqueda de inhibidores de FtsZ que bloqueen el ciclo de división celular de patógenos (Huecas *et al.*, 2015).

La crisofaentina A (Plaza *et al.*, 2010) y su fragmento, la hemi-crisofaentina (Keffer *et al.*, 2013), son productos naturales aislados del alga marina *Chrysophaeum taylori*, y ambos han sido descritos como inhibidores que se unen al sitio del nucleótido en FtsZ (Keffer *et al.*, 2013). Estos compuestos han mostrado un efecto de inhibición de la polimerización de FtsZ y deslocalización del anillo Z en células, aunque no se ha observado filamentación celular en la cepa EnvA1 de *E. coli*, mutante con la membrana permeabilizada (Keffer *et al.*, 2013).

En base a su actividad antimicrobiana previamente descrita en otros trabajos (Kundakovic *et al.*, 2005, Kotan *et al.*, 2010; Benedec *et al.*, 2013), algunos compuestos polifenólicos también han sido descritos como inhibidores relativamente inespecíficos de FtsZ, con efecto en la FtsZ de *E. coli*. Estos compuestos son la viriditoxina, las zantrinas 1 y 4, el totarol, la curcumina, el ácido cafeico y el ácido clorogénico. El cinamaldehído, otro compuesto orgánico responsable del sabor y del olor característico de la canela, inhibe la actividad GTPasa de FtsZ y su polimerización (Domadia *et al.*, 2008). La fenilacrilamida 14, compuesto antibacteriano contra *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes* se ha visto que inhibe la división celular en *S. aureus* (Šarac *et al.*, 2014). La cumarina y su derivado escopoletina (con estructura relacionada con la quercetina y esculetina), que inhiben la actividad GTPasa y la polimerización y de FtsZ en protofilamentos (Duggirala *et al.*, 2014). La curcumina, capaz de unirse a tubulina y mostrar un efecto antiproliferativo y desestabilizante de microtúbulos (Gupta *et al.*, 2012). Este compuesto mostró valores de IC<sub>50</sub> de 17 y 58  $\mu\text{M}$ , frente a cepas de *B. subtilis* 168 y *E. coli* K12 MG1655, respectivamente (Rai *et al.*, 2008). Sin embargo, se desconoce el sitio de unión de estos inhibidores en FtsZ (Schaffner-Barbero *et al.*, 2012), y estudios en nuestro laboratorio con la curcumina no han mostrado indicios de unión al sitio del GTP en la FtsZ de *B. subtilis* (Ruíz-Ávila *et al.*, 2013).

Por último, es importante hacer referencia a los ligandos polifenólicos específicos del sitio del GTP descubiertos en nuestro laboratorio y colaboraciones (Ruíz-Ávila *et al.*, 2013). En la optimización de estos inhibidores se centra la primera parte de esta Tesis. Estos compuestos son los primeros ligandos sintéticos descritos que presentan una estructura distinta a GTP y son capaces de unirse al sitio del nucleótido en BsFtsZ afectando a la polimerización de la proteína *in vitro*. De todos ellos, se identificó el compuesto UCM05 ( $K_d = 2.3 \mu\text{M}$ , MIC en *B. subtilis*: 100  $\mu\text{M}$ , MIC en *S. aureus* MRSA: 37  $\mu\text{M}$ ), y posteriormente sus análogos UCM44 y UCM53, que mejoraron tanto la unión específica a BsFtsZ, con afinidades submicromolares ( $K_{d_{\text{UCM44}}} = 0.7 \pm 0.1 \mu\text{M}$  y  $K_{d_{\text{UCM53}}} = 0.8 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ), como la actividad antibacteriana en *B. subtilis* (MIC UCM44: 25  $\mu\text{M}$ , MIC UCM53: 13  $\mu\text{M}$ ) y en *S. aureus* MRSA (MIC UCM44: 22  $\mu\text{M}$ , MIC UCM53: 4.7  $\mu\text{M}$ ) (Ruiz-Avila *et al.*, 2013). Estas medidas de la afinidad de unión a FtsZ se realizaron mediante un ensayo de desplazamiento de la sonda *mant*-GTP del sitio del GTP en la proteína. Mediante simulaciones de dinámica molecular (MD) se ha estudiado el modo de unión de estos compuestos a FtsZ, mostrando que uno de los anillos fenólicos de los

compuestos mimetiza la interacción que establece el fosfato- $\gamma$  del GTP, mientras que el esqueleto de naftaleno y el otro grupo fenólico se superponen con la base del nucleótido (Ruiz-Avila *et al.*, 2013). Estos inhibidores perturban el ensamblaje normal de la proteína deslocalizando el anillo Z y bloqueando la división celular bacteriana.

Un reto en la búsqueda de inhibidores de FtsZ es evitar que afecten a su homóloga estructural en células eucariotas. Se sabe que algunos de los ligandos descritos como el caso de los C8 derivados, o el compuesto PC190723, son capaces de inhibir de forma selectiva a FtsZ sin afectar a tubulina.

### **I.5 Búsqueda de inhibidores de FtsZ mediante métodos computacionales: cribado virtual**

Los métodos computacionales empleados en la búsqueda de compuestos con potencial para su desarrollo farmacológico son una alternativa a los programas de búsqueda de fármacos tradicionales (Gromiha *et al.*, 2009), los cuales presentaban el inconveniente de ser métodos lentos y costosos. Con estos métodos de cribado se implementan algoritmos que facilitan la búsqueda de candidatos entre quimiotecas de millones de compuestos. Un ejemplo de bases de datos de libre acceso son Zinc (Irwin y Shoichet, 2005), DrugBank (Wishart *et al.*, 2006) y Pubchem (Kim *et al.*, 2016). Como ejemplo de los programas de cribado más utilizados están Glide (Friesner *et al.*, 2004, Halgren *et al.*, 2004) e ICM (Totrov y Abagyan, 1997), pero hay otros en continuo desarrollo. Estos programas recorren bases de compuestos hasta dar con los que mejor se unen de forma teórica a la diana escogida. En la literatura, se han descrito trabajos basados en el uso de técnicas de cribado virtual para la búsqueda de compuestos con afinidad por FtsZ. Un ejemplo ello son los inhibidores de la actividad GTPasa de FtsZ, obtenidos mediante un cribado de quimiotecas de compuestos naturales a partir de la estructura de la FtsZ de la arquea *Methanococcus jannaschii* (Chan *et al.*, 2013).

En la segunda parte de esta Tesis se ha abordado un cribado virtual a partir de distintos enfoques. Un primer paso consiste en la selección de moléculas en base a su afinidad por el

receptor. Con la estructura del receptor se criban quimiotecas con gran número de compuestos para dar con aquellos que encajan virtualmente en el sitio de unión con mayor afinidad, teniendo en cuenta sus posibles conformaciones y también la flexibilidad del sitio del receptor. Un segundo paso, aconsejable para la optimización de la afinidad de los ligandos por el sitio de unión, es realizar un segundo cribado en base a la estructura de los ligandos activos empleando la estructura de aquellos ligandos que experimentalmente han mostrado evidencias de unión al receptor para buscar compuestos homólogos en bases datos.

## II. OBJETIVOS





### OBJETIVOS

El objetivo principal que persigue la presente Tesis es hallar nuevos inhibidores de FtsZ que reemplacen específicamente el GTP de su sitio de unión en FtsZ, así como la determinación de sus mecanismos de acción tanto a nivel molecular como en células bacterianas. En base a esta premisa, se han planteado distintas estrategias para la búsqueda de compuestos:

1. Optimización mediante modificaciones químicas de ligandos conocidos que se unen en el sitio del GTP en FtsZ.
2. Búsqueda, mediante cribado virtual, de nuevos compuestos con estructura química diferente a los inhibidores previamente descritos, que se han enfrentado al bolsillo de unión del GTP en la estructura de FtsZ, y con los que se ha llevado a cabo su posterior validación experimental.
3. Análisis de la unión al sitio del GTP en FtsZ de otros compuestos de la quimioteca UCM e inhibidores descritos en la literatura (colaboraciones con otros laboratorios).

Estas estrategias se han abordado desde distintos enfoques experimentales:

- A. Ensayos bioquímicos para determinar la afinidad por el sitio de unión de GTP en FtsZ y estudiar la modificación del ensamblaje de la proteína.
- B. Caracterización de su efecto en células bacterianas e inhibición funcional del anillo Z. Clasificación de los compuestos en base al perfil citológico como inhibidores.
- C. Cristalografía de los complejos proteína – ligando
- D. Estudio mediante dinámica molecular del modo de unión de los inhibidores más efectivos.



### III. MATERIALES Y MÉTODOS



---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### III.1 Reactivos, tampones y medios empleados

El origen de los reactivos utilizados, así como los empleados para la preparación de tampones, se indica a continuación (por orden alfabético): acetato de uranilo (Merck), acetato quinasa (Sigma-Aldrich), acetil fosfato (Sigma-Aldrich), ácido acético (Merck), ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) (Merck), acrilamida (BioRad), ampicilina (Roche), APS (BioRad), bactotripton (Becton Dickinson & Co), bisacrilamida (BioRad),  $\beta$ -mercaptoetanol (BioRad), Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich), Centricore (Millipore) y Centriprep (10 K y ultra-15) (Amicon), cloranfenicol (Boehringer), cloruro de guanidinio (Calbiochem), DMSO (Merck) DMSO-D6 (Merck), EDTA (Sigma-Aldrich), extracto de levadura (Becton Dickinson & Co), glicerol 87 % (Merck), Hepes (Sigma-Aldrich), HCl (Merck), IPTG (Merck), Kanamicina (Sigma-Aldrich), KCl (Merck), KOH (Merck), marcador de bajo peso molecular (LMWM) (BioRad), MES (Sigma-Aldrich), metanol (Panreac), NaCl (Merck), Pipes (Sigma-Aldrich), PMSF (Calbiochem), SDS (Sigma-Aldrich), TEMED (BioRad), Tris (Merck).

Medios de cultivo: medio 2xYT (16 g/L tripton, 5 g/L NaCl, 10 g/L extracto de levadura, pH 7.0), medio Luria-Bertani (LB) (10 g/L tripton, 10 g/L NaCl, 5 g/L extracto de levadura, pH 7.0), medio SOB (20 g/L tripton, 5 g/L extracto de levadura, 2 mL NaCl 5 M, 2.5 mL KCl 1 M, pH 7.0), medio SOC (SOB + 20 mM glucosa + 20 mM  $\text{MgCl}_2$ ), medio CAMHB II (caldo de BBL Mueller Hinton II ajustado con cationes: 3 g/L extracto de carne bovina, 17.5 g/L caseína ácida hidrolizada, 1.5 g/L almidón, ajustado con sales necesarias para proporcionar 20 - 25 mg/L de calcio y 10 - 12.5 mg/L de magnesio, pH 7.3), medio Penassay (1.5 g/L extracto de carne bovina, 1.5 g/L extracto de levadura, 1 g/L dextrosa, 3.68 g/L  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.32 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5 g/L pepton, 3.5 g/L NaCl, pH 7.0).

Las columnas de cromatografía empleadas para la purificación de proteínas son HiTrap Chelating HP (5 mL), HiTrap Q HP (5 mL), Phenyl HP (5 mL), Desalting (5 mL) (todas de GE Healthcare), y la resina Sephacryl S-300 HR (XK 16/100) (también de GE Healthcare, pero empaquetada en el laboratorio).

A continuación se describe la composición de los tampones y las soluciones preparadas:

Solución de tinción de geles: Coomassie Brilliant Blue G (0.1 %), metanol (45 %), ácido acético (10 %).

Solución para desteñir geles: metanol 5 % + ácido acético 10 %

Tampón A: 50 mM Mes-KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % glicerol, pH 6.5

Tampón A2: 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 % glicerol, pH 8.0

Tampón A3: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KOH, 1 mM EDTA, 0.8 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, pH 7.5

Tampón A4: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

Tampón B: 50 mM Mes-KOH, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % glicerol, 1 M KCl, pH 6.5

Tampón B2: 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 10 % glicerol, 1 M Imidazol, pH 8.0

Tampón B3: 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> - KOH, 1 mM EDTA, pH 7.5

Tampón C: 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 % Glicerol, pH 7.5

Tampón GAB: 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.5 M Glicerol, 1 mM EGTA, 0.1 mM GTP, pH 7.0

Tampón Hepes: 50 mM Hepes-KOH, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 6.8

Tampón PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4

Tampón PEM: 0.1 M PIPES, 2 mM EGTA, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, pH 6.95

Tampón TKM: 50 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0

Los tampones de cromatografía fueron filtrados, con filtros Millipore de 0.2 µm de poro, y degasificados.

### **III.2 Producción de FtsZ de distintas especies**

#### **III.2.1 Transformación de células de *E. coli***

Para la realización de la mayoría de experimentos bioquímicos con los ligandos, se empleó la proteína FtsZ de *Bacillus subtilis* (BsFtsZ). Se utilizaron células competentes de *E. coli* CD41 (DE3) que se transformaron por electroporación con el vector pHis17-

ATCC23857D (Löwe y Amos, 1998; Oliva *et al.*, 2007) que incluye el gen *ftsZ* en su versión completa<sup>1</sup>. Este plásmido incluye el gen de la  $\beta$ -lactamasa que confiere resistencia a ampicilina, y un sistema de expresión controlada mediante el promotor T7, usando como inductor IPTG. Las células, guardadas a -80 °C, se descongelaron en hielo, se les añadió 1  $\mu$ L del ADN plasmídico (100 ng/ $\mu$ L) y se transfirieron a celdas de electroporación (cubetas de 0.2 cm) donde se incubaron 10 minutos en hielo. Acto seguido, se sometieron a un pulso eléctrico con el programa Ec2 (V = 2.5 kV) del electroporador (MicroPulser) de BioRad, tras lo que se les añadió 250  $\mu$ L de medio SOC y se dejaron una hora a temperatura ambiente para que se recuperaran. Pasado este tiempo, las células se plaquearon en placas de Luria-Bertani-agar (LB-agar) con el antibiótico correspondiente y se dejaron crecer durante toda la noche a 37°C.

Mediante un ensayo de expresión a pequeña escala se seleccionan las colonias que mejor expresan la proteína. Con ellas se inoculan 20 mL de medio 2xYT con 100  $\mu$ g/mL de antibiótico (Ampicilina en el caso de expresar BsFtsZ), y se dejan creciendo durante la noche a 37°C con una agitación de 200 rpm (baño Innova 3000)<sup>2</sup>.

También se ha empleado FtsZ de *Staphylococcus aureus* (SaFtsZ), que se ha obtenido mediante expresión en células CAB21 transformadas con el vector pET22b (Amp<sup>R</sup>) que incluye el gen de la proteína en su versión completa (P0A031(Uniprot)), y la resistencia a Ampicilina. (Construcción donada por la Dra. María A. Oliva).

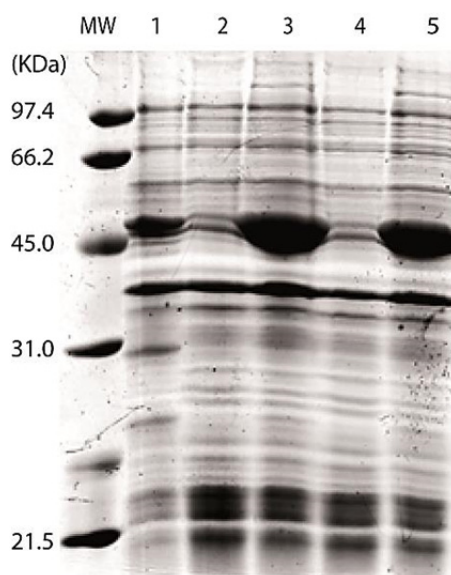
---

<sup>1</sup> Para obtener más copias del plásmido, se realizó una extracción del plásmido mediante el kit Qiagen Miniprep Kit y se transformó la cepa XL1 BLUE de *E. coli* por electroporación. Esta cepa es mucho más eficiente en la replicación de plásmidos y por tanto, más adecuada para la producción de más número de copias.

<sup>2</sup> Estas células transformadas, se pueden guardar para posteriores expresiones de proteína. Para ello se centrifugan los cultivos, una vez alcanzada una OD<sub>600</sub>  $\approx$  0.9, se descarta el sobrenadante, se resuspenden las células en medio de cultivo con un 33% de glicerol, y se almacenan a -80 °C hasta su uso.

### III.2.2 Expresión de FtsZ en células transformadas

La transformación de células competentes se llevó a cabo por electroporación. Se diluyó 1:100 un preinóculo en 1 L de medio en presencia de 100 µg/mL Ampicilina, y se dejó crecer en las mismas condiciones (37 °C, 200 rpm). Cuando el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento (densidad óptica a 600 nm,  $OD_{600} = 0.5 \pm 0.1$ ). La inducción se hizo añadiendo 1 mM de IPTG, durante 3 horas en agitación a 37°C. Pasado este tiempo, se sedimentaron las células centrifugando el cultivo a 800 x g, 10 minutos a 4 °C (rotor SLA-3000, centrífuga Sorvall RC-5C plus), y el sedimento se resuspendió en el tampón TKM para almacenar las células a -80 °C hasta el momento de purificar la proteína.



**Figura 8. Electroforesis en condiciones desnaturalizantes de la expresión de BsFtsZ en *E. coli* BL21 (DE3).** Gel PAGE-SDS al 12% de poliacrilamida (acrilamida - bisacrilamida en presencia de SDS y β-mercaptoetanol. En la **calle MW**, marcador de peso molecular (de las siglas en inglés *Molecular Weight*) en kDa. En la **calle 1**, muestra del preinóculo. Calles **2 y 4**, muestras de los cultivos bacterianos antes de inducir. Calles **3 y 5**, post-inducción de la expresión de BsFtsZ con 1mM de IPTG.

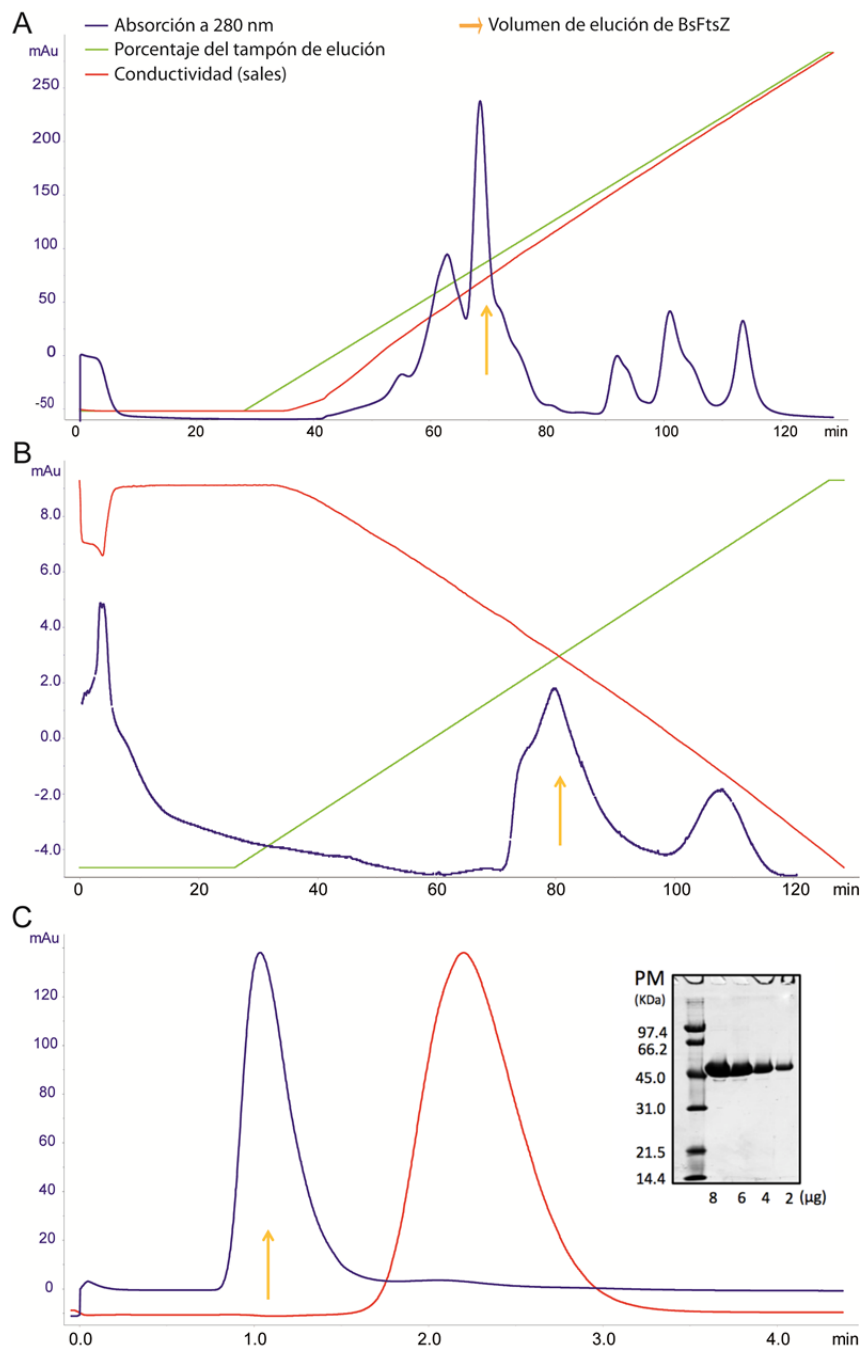
De cada una de las etapas anteriores (preinóculo, inóculo y cultivo inducido) se tomaron muestras que se analizaron mediante electroforesis PAGE-SDS en condiciones desnaturalizantes. Para la migración de las proteínas en el gel se aplicó una corriente eléctrica continua con un voltaje constante de 80 V, y por debajo de 1.5 Amp (**Figura 8**).



### III.2.3 Purificación de FtsZ de *Bacillus subtilis*

Para la purificación de la proteína BsFtsZ, se siguió un protocolo previamente descrito (Ruiz-Avila *et al.*, 2013), con algunas modificaciones. La purificación se realizó en distintas etapas. Una primera etapa de precipitación de la proteína con sulfato amónico (agente floculante) a una saturación del 40 % (precipita un rango determinado de proteínas, dentro de las cuales se encuentra FtsZ); una segunda etapa en la que se lleva a cabo una cromatografía de intercambio aniónico, seguida de una cromatografía de interacción hidrofóbica y por último un cambio de tampón para quitar las sales y procurar un entorno idóneo para la estabilidad de la proteína durante su almacenaje a -80 °C (**Figura 9**). Las distintas etapas cromatográficas y el fraccionamiento de la proteína se realizaron en el equipo AKTA Prime Plus FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) System (GE Healthcare) y para concentrar la proteína se usaron los filtros Centriprep 10K (Amicon) en ciclos de centrifugación de 15 minutos a 3200 rpm (centrífuga Rotina 380 R Hettich).

Primeramente se descongelaron las células resultantes de la expresión (almacenadas a -80 °C) y se les añadió 200 µg/mL de PMSF y 2 µg/mL de leupeptina para inhibir la proteólisis. A continuación se realizó una disrupción celular mediante ultrasonidos en un sonicador (*Brandelin Sonoplus* HD200) con una sonda de un centímetro de diámetro, mediante 5 - 6 pulsos de 20 segundos (con un minuto entre pulso y pulso) al 20 % de potencia (*output* 6). El lisado obtenido se centrifugó en la ultracentrífuga Beckman a 100.000 x g durante 1 hora a 4 °C (rotor 70.1 Ti). El sobrenadante, se recolectó y se transfirió a un vaso de precipitados de cristal sobre hielo. Gradualmente, se añadió sulfato amónico ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) hasta alcanzar una saturación del 40% (242 mg/mL), y se mantuvo en agitación durante 30 minutos a 4 °C. Pasado este tiempo, se sedimentó la proteína centrifugando a 18.000 rpm durante 30 min a 4 °C (rotor SS-34) en la centrífuga RC-5C Plus (Sorvall). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 10 mL del tampón A. Para clarificar la mezcla proteica, se vuelve a centrifugar la muestra, esta vez a 7.000 rpm durante 15 min a 4 °C. Se recuperó el sobrenadante y se diluyó con el tampón A hasta un volumen final de 20 mL.



**Figura 9. Cromatogramas de cada una de las cromatografías realizadas en el proceso de purificación de Bs-FtsZ.** **A.** Cromatografía de intercambio aniónico; **B.** Cromatografía de intercambio hidrofóbico; **C.** Cambio de tampón o *Desalting*. En todos ellos se observa el perfil de elución de la proteína monitorizada con la absorbancia de ésta a 280 nm (línea azul). También se registra el gradiente de elución (línea verde) así como el perfil de elución de las sales (línea roja). Se indica con una flecha amarilla el volumen de elución de la proteína en cada una de las etapas cromatográficas que tienen lugar. En el gel PAGE-SDS: rango lineal de concentraciones de la proteína purificada (diluciones seriadas a partir de la misma alícuota): 8, 6, 4 y 2  $\mu$ g. El porcentaje de pureza de la proteína en cada muestra (distintas concentraciones) cuantificado con el densitómetro calibrado CS-800 de BioRad y mediante el análisis con el programa QuantityOne fue mayor del 95 % en todos los casos.

Con una bomba peristáltica (Gilson *Minipuls 3*), y a un flujo de 1 mL/min, se cargó la muestra en la columna de intercambio aniónico HiTrap Q-HP de 5 mL (GE Healthcare), previamente equilibrada con el mismo tampón. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de 0-100% de tampón B a un flujo constante de 1 mL/min. Se registró el perfil de elución mediante la absorción ultravioleta a 280 nm, y se recolectaron fracciones de 2 mL. Las fracciones se analizaron en un gel PAGE-SDS (12% de poliacrilamida) para localizar la proteína de interés.

Las fracciones que contienen la proteína se concentraron hasta un volumen final de 2 mL, que se diluyó 5 veces en tampón A3, y se cargó la columna de interacción hidrofóbica fenil-agarosa HiTrap Phenyl HP (GE Healthcare) de 5 mL. La proteína se eluyó con un gradiente 0 – 100 % con tampón B3 a un flujo constante de 1 mL/min. De nuevo, la elución se registró mediante la absorción a 280 nm y las fracciones que contenían BsFtsZ se seleccionaron mediante un gel PAGE-SDS. La proteína se concentró hasta 500 µL.

Para realizar el cambio de tampón, se cargó nuevamente la proteína en una columna HP Desalting (GE Healthcare) de 5 mL, equilibrada previamente con tampón C, y se eluyó a un flujo de 1 mL/min. Se recolectaron fracciones de 500 µL con la proteína, que se combinaron y se concentraron de nuevo hasta un volumen final de 500 µL. Se prepararon alícuotas de 25 µL con la proteína concentrada que se conservaron a -80 °C. La concentración de BsFtsZ se determinó como se describirá más adelante.

#### **III.2.4 Purificación de FtsZ de *Staphylococcus aureus***

Para la purificación de la FtsZ de *S.aureus* (SaFtsZ) se emplearon tres etapas cromatográficas: intercambio aniónico, interacción hidrofóbica (ambas en las mismas condiciones que con BsFtsZ) y una filtración en gel (columna Sephacryl S-300 HR (XK 16/100), GE Helathcare), Después de este paso, la proteína se concentró, alícuotó y almacenó en tampón C a -80°C.

### III.2.5 Determinación de la concentración de BsFtsZ purificada

El cálculo de la concentración de proteína se realizó espectrofotométricamente utilizando un espectrofotómetro UV-vis Evolution 300 de doble haz, con cubetas de cuarzo con paso óptico de 1 cm. Dado que FtsZ (generalmente) se purifica con nucleótido unido, Se usaron dos métodos para determinar la concentración total de proteína: uno con 6 M de GdmHCl y otro para extraer y cuantificar el nucleótido unido a FtsZ con HClO<sub>4</sub>.

#### III.2.5.1 Método de doble longitud de onda

Se realizó un espectro de absorción de FtsZ diluida 1:20 en tampón C y en 6 M de GdmHCl (pH 7.0). Se midió la absorción a dos longitudes de onda: 254 nm (longitud de onda máxima de absorción del nucleótido) y 280 nm (longitud de onda máxima de absorción de la proteína). Aplicando la Ley de Lambert-Beer (1), donde  $A$  es la absorción a una longitud de onda específica,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar a esa longitud de onda,  $c$  es la concentración a determinar, y  $l$  es el tamaño del paso óptico (1 cm en este caso); se resolvieron las ecuaciones (2) y (3) para hallar la concentración:

$$A = \epsilon * c * l \quad (1)$$

$$A_{254} = (\epsilon_{proteína(254)} * C_{proteína}) + (\epsilon_{nucleótido(254)} * C_{nucleótido}) \quad (2)$$

$$A_{280} = (\epsilon_{proteína(280)} * C_{proteína}) + (\epsilon_{nucleótido(280)} * C_{nucleótido}) \quad (3)$$

Los coeficientes de extinción molar para el nucleótido en GdmHCl son  $\epsilon_{254} = 13620 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  y  $\epsilon_{280} = 8100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Correia *et al.*, 1987). Los coeficientes de extinción molar de cada proteína han sido estimados de forma teórica teniendo en cuenta el número de fenilalaninas (F), tirosinas (Y) y triptófanos (W) que contienen (**Tabla 1 y 2**).

Tabla 1. Coeficientes de extinción molar de cada aminoácido a 254 nm y a 280 nm (Fasman, 1992).

Aminoácido	$\epsilon_{254}(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	$\epsilon_{280}(\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
<i>F</i>	140	0
<i>Y</i>	309	1280
<i>W</i>	2795	5690

Tabla 2. Coeficientes de extinción molar a 254 nm y a 280 nm de BsFtsZ y SaFtsZ en base a su composición aminoacídica.

Proteína	n° <i>F</i>	n° <i>Y</i>	n° <i>W</i>	$\epsilon_{254} (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1})$
BsFtsZ	9	2	0	1878	2560
SaFtsZ	14	0	0	1960	0

### III.2.5.2 Método de extracción del nucleótido con $\text{HClO}_4$

Para obtener la concentración de FtsZ, una dilución 1:20 preparada de la proteína en tampón C se incubó con 0.5N de  $\text{HClO}_4$  a 4°C durante 10 minutos. A continuación se centrifugó la muestra a 12000 rpm durante 10 minutos a 4°C (centrífuga Rotina 380 R Hettich, rotor angular de 45 °, 1789-A), y se separó el sobrenadante del sedimento. Se hizo un espectro de absorción al sobrenadante, donde se encuentra el nucleótido que llevaba unido la proteína. Aplicando la ecuación (1), se calculó la concentración del nucleótido teniendo en cuenta que el coeficiente de extinción molar del mismo en medio ácido es  $\epsilon_{254} = 12400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Díaz y Andreu, 1993) y la concentración de la proteína se calculó con la ecuación (4),

$$C_{prot} = \left( \frac{A_{280} - (\epsilon_{nucl(280)} \times C_{nucl})}{\epsilon_{prot(280)}} \right) \quad (4)$$

También se calculó el número de moléculas de nucleótido unido por molécula de FtsZ, *r*. En el caso de BsFtsZ, el valor *r* es de 0.02, por lo que la proteína se purifica prácticamente libre de nucleótido, pero en la FtsZ de otras especies bacterianas este valor puede ser más significativo, por lo que es imprescindible realizar este método para calcular correctamente la concentración de proteína purificada.

### III.2.6 Determinación de la concentración de SaFtsZ purificada

Dado que SaFtsZ no absorbe a 280 nm por no tener tirosina ni triptófano en su secuencia aminoacídica (**Tabla 2**), el cálculo de la concentración para SaFtsZ se llevó a cabo mediante una cuantificación por Bradford, realizando una recta patrón con BsFtsZ.

### III.2.7 Determinación del grado de homogeneidad de la proteína obtenida

Para determinar el grado de homogeneidad y el estado de agregación de la proteína purificada, se emplearon distintos métodos que se describen a continuación. Estos experimentos, tanto DLS (*Dynamic Light Scattering*) como AUC (*Analytical Ultracentrifugation*), se llevaron a cabo en el servicio de Ultracentrifugación Analítica del CIB-CSIC, por los doctores Juan Román Luque Ortega y Carlos Alfonso Botello.

#### III.2.7.1 Dispersión dinámica de luz (DLS)

Con la técnica de la dispersión dinámica de luz (DLS) se puede determinar la distribución de coeficientes de difusión de partículas en solución o macromoléculas. Se trata de una técnica que permite evaluar si se dan interacciones macromoleculares en solución, en este caso, como consecuencia de la formación de agregados de proteína. Los experimentos de DLS se llevaron a cabo con el equipo Protein Solutions DynaPro MS/X Instrument (Protein Solutions, Piscataway, NJ) a 25 °C utilizando una cubeta de dispersión de la luz de 90 °, en las mismas condiciones experimentales que se emplearon en el ensayo de velocidad de sedimentación. Previo a las mediciones, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12.000 g. Los datos fueron recogidos y analizados con el programa Dynamics V6 software.

### III.2.7.2 Ultracentrifugación Analítica (AUC) – Velocidad de sedimentación

Esta técnica consiste en un conjunto de métodos que permiten la determinación del tamaño de las macromoléculas, la detección y cuantificación de las interacciones reversibles en solución (incluyendo homo- y hetero- asociaciones proteína-proteína, interacciones DNA-proteína e interacciones receptor-ligando).

Para estos experimentos BsFtsZ (15  $\mu$ M) se incubó con GDP (500  $\mu$ M), para favorecer un estado nativo de la proteína. Las muestras se prepararon en tampón Hepes (50 mM Hepes, 50 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, pH 6.8) y 2% de DMSO, y se cargaron (320  $\mu$ L) en las celdas de ultracentrifugación analítica. Esta técnica ha sido también empleada para el análisis de la interacción proteína – ligando. En estos casos la proteína se incubó, en condiciones similares, en presencia de 30  $\mu$ M de los compuestos a estudio.

Los experimentos se llevaron a cabo a 25 °C y 48.000 rpm en una ultracentrífuga analítica XL-I (Beckman-Coulter Inc.), equipada con un sistema de detección de la absorbancia UV-VIS y de interferencia Raleigh. Se empleó un rotor An-50/Ti con celdas de Epon-Charcoal de 12 mm de doble sector central. Los perfiles de sedimentación se registraron simultáneamente por interferencia y a 310 nm. La distribución de los coeficientes de sedimentación se calculó mediante un sistema de ajuste de mínimos cuadrados de los datos de velocidad de sedimentación utilizando la distribución continua  $c(s)$  del modelo de la ecuación diferencial de Lamm (Lamm, 1929), que describe la sedimentación y difusión de un soluto en condiciones de ultracentrifugación, aplicado por el programa SEDFIT 14.7.g. (Schuck, 2000). Los valores  $s$  experimentales se corrigieron con las condiciones estándar (agua, 20 ° C,) utilizando el programa de SEDNTERP (Laue *et al.*, 1992) para obtener los valores  $s$  estándar correspondientes ( $S_{20,w}$ ).

### III.3 Origen y selección de los compuestos empleados

Los compuestos ensayados en esta tesis se han seleccionado mediante un cribado virtual, enfrentando la estructura cristalográfica de la proteína con la estructura química pequeñas moléculas accesibles en quimiotecas de compuestos sintéticos y comerciales. La

selección de los compuestos que se estudiaron experimentalmente se llevó a cabo en base a los resultados teóricos de afinidad hacia la diana de interés, el receptor. Este cribado se hizo en colaboración con el laboratorio del Dr. Pablo Chacón del Instituto de Química Física Rocasolano (CSIC) (<http://chaconlab.org>). Los métodos de cribado virtual se han empleado en dos situaciones:

1) Para una selección de una pequeña quimioteca de compuestos sintetizados por el laboratorio de Química Médica, Dpto. Química Orgánica I de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid; de esta selección surgieron los compuestos UCM, tal y como se describe en Ruiz-Avila *et al.*, 2013, y a partir de los cuales se ha llevado a cabo la mejora y obtención de nuevos ligandos más afines (Artola *et al.*, 2015). Esta nueva serie de compuestos proviene del diseño racional y síntesis, en base a los resultados positivos obtenidos con los compuestos UCM de la serie anterior.

2) Para una selección a partir de la base de datos ZINC (que incluye compuestos en sus bases de datos de casas comerciales Mcule, Enamine, Life Chemicals, Interchemicals, Asinex, entre otras), con compuestos con estructuras no redundantes. En base este cribado se seleccionaron compuestos con las mejores puntuaciones de unión usando los parámetros estándar del programa. Una vez se dio con ligandos cuya afinidad se pudo determinar experimentalmente, se pasó a un ajuste molecular más específico, en el que se tuvieron en cuenta diferentes conformaciones de los receptores (Bottegoni *et al.*, 2009). En este segundo ajuste basado en la estructura del ligando se emplearon las quimiotecas comerciales MolPort ([www.molport.com](http://www.molport.com)) y Mcule ([www.mcule.com](http://www.mcule.com)), que permiten la búsqueda de estructuras químicamente similares a la molécula planteada.

Los cribados virtuales para ambos proyectos se realizaron con el paquete bioinformático ICM (Internal Coordinate Mechanics) (Totrov y Abagyan, 1997) versión 3.6-1e., con los parámetros por defecto, enfrentando el sitio de unión del GTP en BsFtsZ en su forma apo, estructura 2VXY (PDB ID). Este programa computacional se basa de un sistema de coordenadas internas para predecir las conformaciones posibles que pueden adoptar los ligandos flexibles en presencia de un receptor (Totrov y Abagyan, 1997). En todo momento se empleó el campo de fuerza MMFF (Halgren, 1996), con un ajuste molecular mediante minimización cartesiana en ausencia del receptor y en base a una función de energía de coordenadas internas para la búsqueda de ligandos, empleando ECEPP/3 como términos energéticos (Nemethy *et al.*, 1992). Para el ajuste molecular de los ligandos se añadió, al cálculo de probabilidad parcial, el método de Monte Carlo (Abagyan y Totrov,



1994), que aprovecha números aleatorios para facilitar el cálculo computacional. Antes de simular la interacción proteína-ligando, se realizó un ajuste BsFtsZ-GDP para validar el método y se sometió a una simulación de dinámica molecular de 100 nanosegundos (ns). Este ajuste se comparó con la estructura cristalográfica conocida que incluye el GDP (2RHL). Para este ajuste se definió una caja para el sitio de nucleótido considerando las siete conformaciones diferentes obtenidas con la simulación de dinámica molecular de BsFtsZ en la forma apo. Los límites de la caja se definieron con la estructura 2RHL. Se siguió el protocolo del método del programa para definir la estereoquímica, los átomos de hidrógeno, estados protonados de los ligandos, formas tautoméricas, coordenadas atómicas 3D y la normalización de los ajustes.

Otros compuestos probados en esta tesis provienen de la quimioteca interna del laboratorio de Química Médica de la UCM y que fueron seleccionados por presentar características similares a compuestos probados en el proyecto anterior. También se han estudiado compuestos que provienen de colaboraciones con otros laboratorios (compuestos del Dr. Kuldipsinh P. Barot y Dr. Iwao Ojima).

### **III.3.1 Preparación de stocks de los compuestos en DMSO**

Una vez recibidos los compuestos se pesaron exactamente cantidades cercanas a 3 mg de cada uno de ellos en una balanza AG135 Mettler Toledo, y se disolvieron en DMSO-D6 a una concentración de 100 mM. Se comprobó la solubilidad de los compuestos en DMSO-D6 centrifugándolos a 13.000 rpm, 5 minutos (centrífuga Mikroliter, Hettich). A partir de este *stock* se prepararon otros más diluidos en DMSO, que se emplearon en los ensayos experimentales. Las soluciones se guardaron, identificadas debidamente, a -20 °C con gel de sílice desecante.

### **III.3.2 Determinación de la solubilidad de los ligandos en el tampón experimental**

Se determinó la solubilidad de los compuestos en el tampón experimental Hepes, pH 6.8, con 2 % de DMSO. Para una primera aproximación, se prepararon alícuotas a concentraciones 30, 50 y 100  $\mu\text{M}$  en un volumen final de 300  $\mu\text{L}$ . Se registró el espectro de absorción entre las longitudes de onda de 240 nm y 600 nm utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm y se comprobó que el compuesto no absorbiera a aquellas longitudes de onda en las que también lo hace nuestra sonda fluorescente de referencia: *mant*-GTP (absorción a 357 nm). Estas muestras se centrifugaron a 100.000 rpm durante 20 minutos a 25 °C en tubos de policarbonato usando el rotor TLA-100 de la ultracentrífuga Beckman. Se hizo de nuevo un barrido espectrofotométrico y se comparó con los espectros realizados antes de centrifugar la muestra. La solubilidad puede incrementarse en presencia de la proteína o en el medio de cultivo. Para establecer el límite de solubilidad de cada compuesto, en algunos casos fue necesario incrementar o disminuir las concentraciones probadas hasta dar con un valor lo más cercano posible al límite de solubilidad.

### **III.3.3 Comprobación por HPLC-MS de la pureza e identidad química de los compuestos comprados**

Para la elucidación de la identidad química de los ligandos comprados, se empleó la cromatografía líquida de alta eficacia asociada a un espectrofotómetro de masas (HPLC-MS), y la espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Los ensayos por HPLC-MS se han llevado a cabo con la ayuda del Dr. José Fernando Díaz Pereira del laboratorio Agentes Estabilizantes de Microtúbulos (CIB), y los espectros de RMN fueron realizados por el Dr. Francisco Javier Cañada Vicinay, del laboratorio de RMN y reconocimiento molecular (CIB).

Se empleó un equipo HPLC Agilent 1100 series, con una columna C18 de fase reversa (Agilent Eclipse XDB-C18), conectado a un espectrómetro de masas (MS) 6120 Quadrupole LC/MS con fragmentación por API-ES (Ionización a presión atmosférica - Electrospray). Previamente al análisis de las muestras se realizó un estudio FIAS (Flow

Injection Atomic Spectroscopy) para decidir cuáles son las mejores condiciones para obtener una fragmentación óptima de los iones de estudio y una señal adecuada para su detección. Se ajustaron los parámetros del fragmentador, presión de nebulizador, voltaje del capilar, presión del gas de secado, etc. Para cada una de las variables a modificar se fijaron el resto de condiciones, hasta dar con la combinación óptima de parámetros que mejorasen la señal de la medida. Se prepararon muestras de 40  $\mu$ L con 100 - 200  $\mu$ M de compuesto (inicialmente disuelto en DMSO-D6) en una fase móvil de MeOH al 80 % + 0.1 % de ácido fórmico. Las muestras se inyectaron mediante el brazo robot del propio HPLC y, con la fase móvil a un flujo de 0.2 mL/min, se procedió a la separación de los compuestos en la cromatografía líquida y a su posterior fragmentación y pulverización en el interior de la cámara del MS por el nebulizador en electrospray a una presión de 50 psig, una temperatura del gas de 200 °C, un flujo del gas de secado de 8 L/min, y un valor de fragmentación de 200 V. Los picos de cada ión se identificaron teniendo en cuenta el peso molecular de cada uno de los compuestos analizados (espectros de algunos de ellos, **Figuras 46 y 47 del Material Suplementario**). La pureza de cada uno de los compuestos sintetizados en el grupo de Química Médica de la Facultad de Química de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) también se comprobó por HPLC, y en todos los casos se obtuvo un índice de pureza mayor del 95%.

Para los ensayos de RMN, las muestras con los ligandos se prepararon a una concentración de 10 mM en tampón Hepes (pH 6.8) y una muestra control con DMSO al 2 % en el mismo tampón. Los espectros obtenidos (algunos se muestran en la **Figura 48 del Material Suplementario**) se analizaron teniendo en cuenta la información teórica disponible con cada compuesto, facilitada por las casas comerciales a las que se compraron.

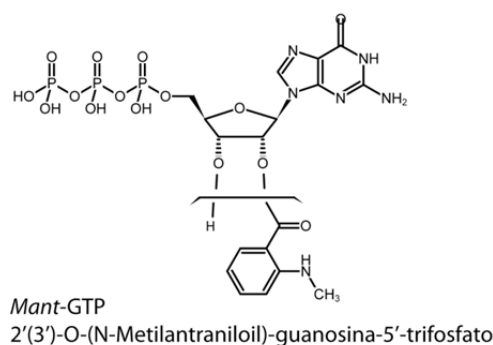
### **III.4 Métodos de competición de los ligandos por el sitio de unión del GTP en FtsZ**

#### **III.4.1 Método de desplazamiento de *mant*-GTP: determinación de la afinidad de unión al sitio del GTP por cambios en la anisotropía de fluorescencia**

La medida de la anisotropía de fluorescencia es una técnica establecida para determinar indirectamente la unión proteína - ligando. Su principio se basa en el fenómeno de difusión

rotacional del ligando fluorescente expuesto a luz polarizada, que varía cuando este se encuentra en su forma unida a cuando está en su forma libre, o lo que es lo mismo, la anisotropía registrada será menor cuanto más libertad rotacional tenga el fluoróforo en el medio en el que se encuentre (Lakowicz, 1999). La sonda fluorescente utilizada es 2'(3')-O-(N-Metilantraniloil)-GTP (*mant*-GTP) (**Figura 10**), un derivado de GTP que se une a los monómeros de BsFtsZ con una afinidad de  $K_{d_{mant-GTP}} = 1.0 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{M}$  (Ruíz-Ávila *et al.*, 2013). La unión y el desplazamiento de *mant*-GTP de FtsZ se siguen por cambios en la anisotropía de fluorescencia de la sonda, excitando a 357 nm y recogiendo su emisión a 445 nm. El nucleótido fluorescente, *mant*-GTP, se une al sitio del nucleótido en los monómeros de FtsZ, registrándose un aumento en la anisotropía de fluorescencia y produciéndose un descenso de los valores de anisotropía cuando la sonda es desplazada por un competidor.

Este método de desplazamiento de *mant*-GTP permite medir, de forma indirecta, la unión de ligandos al sitio del GTP en FtsZ, aunque estos ligandos tengan una estructura química diferente a los nucleótidos (Schaffner-Barbero *et al.*, 2010).



**Figura 10. *Mant*-GTP.** Estructura de la sonda fluorescente utilizada en los ensayos de desplazamiento ( $K_{d_{mant-GTP}} = 1.0 \pm 0.1 \text{ } \mu\text{M}$ ).

Las curvas de desplazamiento se han realizado empleando 750 nM de Bs-FtsZ, 500 nM de *mant*-GTP en tampón Hepes, 2% de DMSO y 10 mM  $\text{MgCl}_2$ . A esta solución se le añadieron concentraciones crecientes de competidor y se midió la anisotropía de fluorescencia. Se realizaron los siguientes controles: con 200  $\mu\text{M}$  de GTP en presencia de proteína y con la sonda, sin añadir proteína y con *mant*-GTP, con proteína y sin la sonda, y con compuesto sin proteína ni *mant*-GTP. Las medidas se iniciaron 4 minutos después de incubar la muestra con la proteína en presencia de los compuestos.

Las medidas se realizaron en un espectrofluorímetro FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon), cuya disposición emisor/detector está configurada en forma L, empleando cubetas de cuarzo de 2 x 10 mm. Se empleó un ancho de banda de 5 nm para la excitación a 357nm y se recogió la emisión a 445 nm con un ancho de banda de 10 nm. En cada medida se obtuvieron datos de intensidad de emisión de fluorescencia de luz polarizada vertical y horizontal, empleando para la excitación luz polarizada en ambos planos.  $I_{VV}$  y  $I_{VH}$  son las medidas de las intensidades de fluorescencia excitando la muestra con luz polarizada vertical y recogiendo la emisión en vertical y en horizontal, respectivamente.  $I_{HV}$  y  $I_{HH}$  se corresponden con la intensidad de fluorescencia registrada excitando con la luz polarizada en horizontal y recogiendo la emisión en vertical y en horizontal, en cada caso.

Con estos parámetros, el software del equipo (FluorEssence™), calcula el valor de anisotropía ( $r$ ), aplicando el factor "G" instrumental (5), que en las medidas realizadas se mantuvo cercano a 1.0, y que compensa la sensibilidad del sistema de detección de la luz polarizada vertical y horizontalmente.

$$G = \frac{(I_{hv})}{(I_{hh})} \quad (5)$$

Para hallar el valor de anisotropía ( $r$ ), el software emplea la fórmula siguiente (6):

$$r = \frac{I_{vv} - G \times I_{vh}}{I_{vv} + 2 \times G \times I_{vh}} \quad (6)$$

La fracción de *mant*-GTP unido a BsFtsZ se calcula de la siguiente forma (7):

$$vb = \frac{(r - rf)}{[(r - rf) + R \times (rb - r)]} \quad (7)$$

Donde  $rf$  es la anisotropía del *mant*-GTP libre ( $rf = 0.025$ ),  $rb$  es la anisotropía del *mant*-GTP unido a la proteína ( $rb = 0.214$ ), y  $R$  es el cociente entre la intensidad de fluorescencia del *mant*-GTP libre y unido a BsFtsZ ( $R = 2.78$ ) (Ruiz-Avila *et al.*, 2013). Este incremento en la intensidad de emisión de fluorescencia que sufre el *mant*-GTP al unirse a FtsZ ha de tenerse en cuenta para evitar la obtención de valores de  $K_b$  erróneos.

Con los datos de  $vb$  obtenidos, para cada una de las concentraciones medidas, se realizó un ajuste por mínimos cuadrados mediante el programa Equigra5 (Díaz y Buey, 2007), para llegar a una constante de unión ( $K_b$ ) de cada ligando por el sitio de la proteína. Estas son las ecuaciones que resuelve el programa para ajustar la constante de afinidad de unión ( $K_b$ ) de cada ligando:

$$K_{mant-GTP} = [P * mant-GTP] / ([P]_f * [mantGTP]_f) \quad (8)$$

$$K_{(L)} = [P * L] / ([P]_f * [L]_f) \quad (9)$$

$$[mantGTP]_f = [mantGTP]_T - [P * mantGTP] \quad (10)$$

$$[L]_f = [L]_T - [P * L] \quad (11)$$

$$[P]_f = [P]_T - [P * L] - [P * mantGTP] \quad (12)$$

Previamente a la realización de este experimento, se realizó una medida del espectro de fluorescencia de cada compuesto para asegurar que no se tratara de compuestos fluorescentes que interfirieran a la longitud de onda máxima de excitación y emisión de la sonda fluorescente ( $\lambda_{\text{máx}} = 357$  y  $445$  nm, respectivamente), hecho que podría distorsionar las medidas obtenidas en el ensayo. La afinidad se ha representado, en la mayoría de los casos como la constante de disociación o  $K_d$  ( $K_d = 1/K_b$ ).

#### III.4.2 Método de competición con $^3\text{H}$ -GTP

Se ha empleado este método para determinar la capacidad de los ligandos de desplazar al ligando natural marcado radioactivamente del sitio de unión en la proteína. Al tratarse de átomos de hidrógeno sustituidos por tritio en la molécula de GTP ( $^3\text{H}$ -GTP), este método ofrece, en principio, la ventaja de poder comprobar la competición de los inhibidores por el sitio de unión del nucleótido en FtsZ. La afinidad de esta sonda radiactiva ( $^3\text{H}$ -GTP) es mayor que la sonda fluorescente (*mant*-GTP) empleada en el ensayo anterior, puesto que la sonda fluorescente aporta un volumen extra al GTP que afecta significativamente a la afinidad del nucleótido por el sitio de unión y a su estabilidad en el bolsillo catalítico de la proteína.

Para realizar los ensayos se prepararon muestras en  $200 \mu\text{L}$  con  $100 \text{ nM}$  de  $^3\text{H}$ -GTP (diluido isotópicamente hasta aproximadamente  $50.000 \text{ dpm} / \mu\text{L}$ ),  $100 \text{ nM}$  de proteína, y concentraciones crecientes del ligando de interés, en tampón Hepes (pH 6.8),  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ . A continuación se centrifugaron las muestras en la ultracentrífuga TLX (Beckman) usando el rotor TLA-100 durante 1.5 horas a  $386.000 \times g$  ( $100.000 \text{ rpm}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  y se separaron  $100 \mu\text{L}$  de la mitad superior y  $100 \mu\text{L}$  de la mitad inferior de los tubos de

policarbonato. A ambas partes separadas se les añadió 1.3 mL del líquido de centelleo HISAFE 2 y se midieron en un contador de centelleo 1450 microbeta Wallac Trilux (PerkinElmer) la cuentas radiactivas en cada una de las mitades de todas las muestras. La concentración de  $^3\text{H}$ -GTP es proporcional a la actividad detectada en cuentas por minuto (cpm), y con estas medidas se obtiene la actividad registrada en la parte superior de los tubos ( $\text{cpm}_{\text{top-z}}$ ) y la actividad en la parte inferior ( $\text{cpm}_{\text{bot-z}}$ ). De esta manera se determina la concentración de  $^3\text{H}$ -GTP libre en relación al  $^3\text{H}$ -GTP unido a BsFtsZ en la parte inferior del tubo (sedimenta con la proteína). En el cálculo se corrigen (con el factor  $F_j$ ) las cuentas de ligando radiactivo que sedimenta a consecuencia de la fuerza centrífuga (en su forma libre), mediante las medidas obtenidas con controles realizados en ausencia de proteína. Las ecuaciones empleadas para el cálculo de  $^3\text{H}$ -GTP unido a la proteína ( $[\text{H-GTP}]_b$ ), respecto del total ( $[\text{H-GTP}]_T$ ), con las medidas realizadas, se describen en el trabajo de Schaffner-Barbero *et al.*, 2010.

La determinación de la constante afinidad aparente de los ligandos por el sitio de unión se resolvió como se ha explicado en el ensayo de competición por la sonda *mant*-GTP, mediante ajustes iterativos de los datos con el programa Equigra5 (Díaz y Buey, 2007). La representación gráfica de las curvas de desplazamiento se llevó a cabo con el programa Sigmaplot (Systat Software).

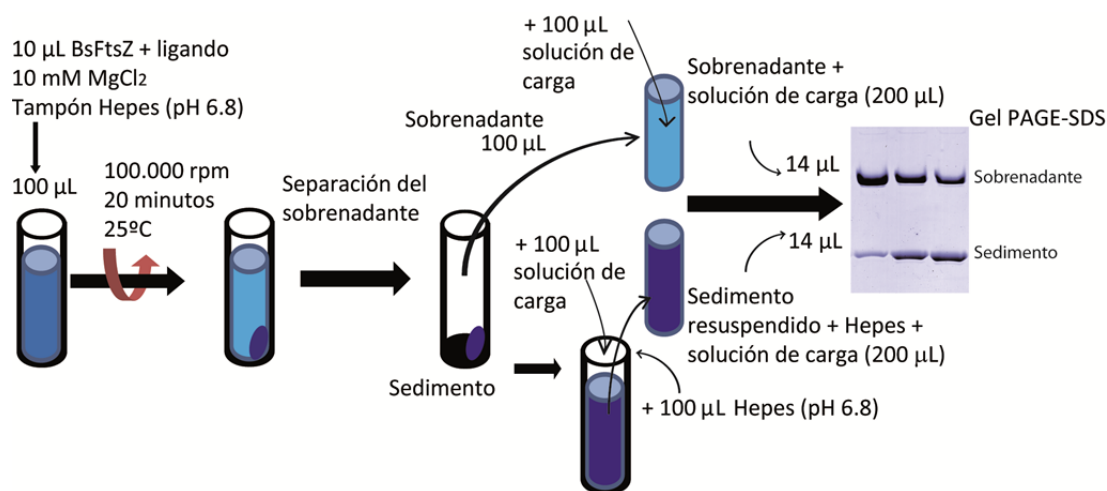
La utilización de este ensayo radiactivo se descartó a lo largo de la realización de la Tesis por dificultades de mantenimiento y reproducibilidad del contador de centelleo, y solo se empleó en casos puntuales para confirmar resultados obtenidos con el método fluorescente.

### **III.5 Efecto de los ligandos en el ensamblaje de la proteína**

Para determinar si la unión de los ligandos modifica el ensamblaje de BsFtsZ, se han empleado varias técnicas: ensayos de sedimentación de los polímeros de FtsZ por ultracentrifugación, cursos de tiempo registrando la dispersión de luz de los polímeros de FtsZ, y la observación de los mismos mediante microscopía electrónica.

### III.5.1 Ensayo de sedimentación de polímeros de FtsZ

Para este tipo de ensayo se prepararon, en un volumen final de 100  $\mu\text{L}$ , muestras con 10  $\mu\text{M}$  de BsFtsZ en tampón Hepes, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2% de DMSO y cada uno de los ligandos a la concentración elegida. Las muestras se centrifugaron en tubos de policarbonato en el rotor TLA-100 en una centrífuga Optima TLX (Beckman), a 100.000 rpm durante 20 minutos a 25  $^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, se separó el sobrenadante (100  $\mu\text{L}$ ) y se resuspendió el sedimento en el mismo volumen de tampón Hepes (100  $\mu\text{L}$ ). En los sedimentos y sobrenadantes de cada muestra se añadieron otros 100  $\mu\text{L}$  de Solución de Carga (*Sample Buffer*) de gel de electroforesis. El *Sample Buffer* contiene SDS, que ayuda a resuspender el sedimento de los tubos de policarbonato. Se cargaron 14  $\mu\text{L}$  de los sedimentos de las muestras en un gel PAGE-SDS. Con una diferencia de tiempo de carga de 15 minutos (a 80 V), se cargaron los sobrenadantes en los mismos pocillos en los que se cargaron los sedimentos correspondientes a cada muestra (**Figura 11**).



**Figura 11. Diagrama del experimento de sedimentación de polímeros de BsFtsZ.** Sobrenadante y sedimento se separan después de centrifugar las muestras. El sedimento se resuspende con el mismo volumen de tampón Hepes y se le añade a ambas partes 100  $\mu\text{L}$  de *Sample Buffer*, que ayuda a resuspender las muestras y permite cargarlas en un gel de electroforesis. Se cargan 14  $\mu\text{L}$  del sedimento resuspendido y en un intervalo de carrera de 15 minutos a 80 V en el gel, se cargan 14  $\mu\text{L}$  de los sobrenadantes en los mismos pocillos correspondientes a cada muestra.



Para determinar la concentración de polímeros y proteína en forma libre se escanearon los geles con el densitómetro calibrado CS-800 de BioRad, se cuantificaron las bandas de proteína con el programa QuantityOne (BioRad) y se calculó el porcentaje de inhibición del ensamblaje, empleando la ecuación (13). Este resultado se obtiene empleando los valores del porcentaje total de proteína sedimentada en presencia del compuesto, en presencia de GTP y en presencia de GDP.

$$\% \text{ Inhibición del ensamblaje} = 100 * \left[ 1 - \frac{(\% \text{Compuesto sedimentado} - \% \text{GDP sedimentado})}{(\% \text{GTP sedimentado} - \% \text{GDP sedimentado})} \right] \quad (13)$$

### III.5.2 Ensayo de sedimentación de microtúbulos

La tubulina eucariota se obtuvo en nuestro laboratorio mediante el protocolo de purificación a gran escala de tubulina a partir de cerebro bovino (homogenización de tejidos, eliminación de las membranas celulares, fraccionamiento con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , cromatografía de intercambio aniónico, precipitación con  $\text{MgCl}_2$ , diálisis y almacenaje de la proteína en nitrógeno líquido) descrito en Andreu, 2007. La concentración de tubulina se determinó espectrofotométricamente dado su coeficiente de extinción molar a 276 nm ( $\epsilon_{276} = 116000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Andreu y Timasheff, 1982).

El efecto de los ligandos en el ensamblaje de tubulina se determinó mediante un ensayo de sedimentación de microtúbulos, que se llevó a cabo con 15  $\mu\text{M}$  de tubulina en tampón GAB, con 6 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 2% de DMSO. Se añadió 1 mM de GTP a las muestras y se incubaron, en presencia de los compuestos a la concentración deseada, durante 45 minutos a 37 °C. Se prepararon controles con 1 mM de GDP, en lugar de GTP, y con 50  $\mu\text{M}$  de podofilotoxina (inhibidor del ensamblaje de microtúbulos). Las muestras se centrifugaron a 50.000 rpm durante 10 minutos, a 37°C, en el rotor TLA-100, en una centrífuga Optima TLX (Beckman). Sobrenadante y sedimento se separaron de la misma forma a como se hizo en el ensayo de sedimentación de polímeros de FtsZ. Se cargó un gel PAGE-SDS con 10  $\mu\text{L}$  de cada una de ellas y las bandas se cuantificaron para poder calcular el porcentaje de inhibición para cada muestra, empleando la ecuación del apartado anterior (13).

### III.5.3 Ensayo de dispersión de luz

Para las medidas de la dispersión de luz a ángulo recto se usó el espectrofluorímetro FluoroMax-4 (Horiba Jobin Yvon). Las medidas registran la luz dispersada a ángulo recto después de atravesar la muestra (500  $\mu$ L en una cubeta de 10 mm de paso óptico). Los polímeros o agregados de FtsZ dispersan la luz al atravesar la muestra, por lo que, mediante la intensidad de luz dispersada, se monitoriza la polimerización de la proteína a tiempo real. Con esta técnica se puede estudiar el efecto de los ligandos en la modulación del ensamblaje de la proteína.

La longitud de onda de emisión y excitación de luz empleada fue de 350 nm con un ancho de banda de 0.5 nm y un tiempo de integración de 1 segundo. Las muestras de BsFtsZ (10  $\mu$ M en tampón Hepes) se incubaron 5 minutos con 10 mM de  $MgCl_2$ , y se les añadió a continuación 200  $\mu$ M de GTP. Se realizaron controles en ausencia de compuesto, en ausencia de nucleótido, y añadiendo 2 % de DMSO.

Este ensayo se realizó también en presencia de un sistema de regeneración de GTP, que produce un recambio continuo de fosfato por GTP en el medio y se evita así la despolimerización de la proteína. Las muestras se prepararon con 10  $\mu$ M de BsFtsZ en tampón Hepes y en presencia del sistema de regeneración de nucleótido (SR) (1 unidad/mL de acetato quinasa y 15 mM de acetil fosfato), a los 5 minutos se añadió 10 mM de  $MgCl_2$ , y a los 10 minutos 50  $\mu$ M de GTP. Se añadieron los compuestos a la concentración deseada. Se realizaron controles con DMSO en lugar de los compuestos para comparar el efecto.

### III.5.4 Observación por microscopía electrónica de los polímeros formados

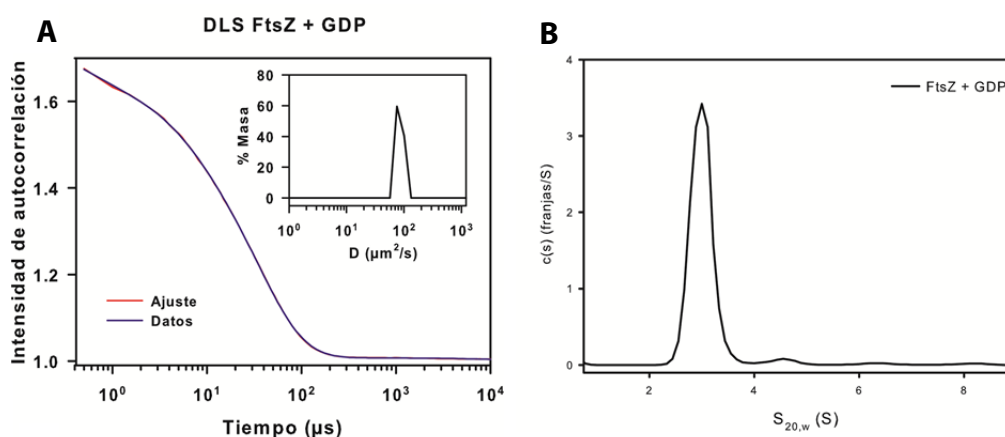
Los polímeros de FtsZ se observaron por microscopía electrónica de transmisión por tinción negativa. Se prepararon rejillas de cobre (G400) con la solución al 0.25 % de resina de formvar (Ted Pella, Inc.) en cloroformo y sombreándolas ligeramente con carbón (Servicio de Microscopía Electrónica del CIB-CSIC). Para la preparación de las muestras, se recogieron 20  $\mu$ L de muestra (10  $\mu$ M de BsFtsZ, con 10 mM de  $MgCl_2$ , en tampón Hepes y en presencia de los compuestos a la concentración deseada en cada caso) y se

incubaron en las rejillas durante 1 minuto. A continuación, cada rejilla se lavó pasándola por 4 gotas de 20  $\mu$ L de una solución de acetato de uranilo al 2 %, y se dejó tiñendo durante 1 minuto en la última gota. El exceso de acetato de uranilo se retiró de las rejillas en un papel de filtro y se guardaron en un rejillero hasta su observación en el microscopio electrónico. Las imágenes se tomaron a 40.000 aumentos usando el microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1230 a 100Kv acoplado a la cámara digital CMOS, TemCamf416 TVIPS (16 MegaPixel).

## IV.6 Cristalografía del complejo FtsZ-ligando

### IV.6.1 Estado de agregación de la preparación de BsFtsZ para cristalografía

Para los ensayos de cristalización, se comprobó previamente el estado de agregación de BsFtsZ obtenida después de la purificación mediante ensayos de DLS (**Figura 12A**) y AUC (**Figura 12B**). En los ensayos de AUC se ha monitorizado la velocidad de sedimentación de la proteína en ausencia de ligando y en presencia de 500  $\mu$ M de GDP. En terminos generales, se determinó que con este protocolo de purificación seguido, se consigue una población de proteína monomérica mayor del 95 %. Por DLS se comprobó que la proteína está en su estado nativo.



**Figuras 12. Comprobación del estado de agregación de proteína para los ensayos de cristalografía. A.** DLS de la proteína para evaluar su homogeneidad. Tal y como se ve en el experimento de DLS, el grado de plegamiento de la proteína es adecuado para considerar que la proteína se encuentra en su estado nativo (polidispersidad menor del 15% para el pico mayoritario: 100% de la masa detectada en la difusión). Experimento preparado con 15  $\mu$ M de BsFtsZ y 500  $\mu$ M de GDP en tampón Hepes (pH 6.8), para favorecer el estado monomérico (no ensamblado) de la proteína. **B.** Resultado de velocidad de sedimentación (AUC) de la proteína en ausencia de ligando y en presencia de 500  $\mu$ M de GDP.

#### IV.6.2 Preparación de los cristales de proteína en presencia del ligando

Durante el desarrollo de la presente tesis, se realizó una estancia de cuatro meses en el laboratorio de la doctora Andrea Dessen (PATBAC team), Institut de Biologie Structurale (IBS) – Grenoble (Francia), con el fin de obtener la estructura cristalográfica de la proteína formando complejo con aquellos ligandos más prometedores. Este trabajo se llevó a cabo bajo la supervisión del doctor Carlos Contreras-Martel. Para la obtención de cristales de proteína se reprodujeron las distintas condiciones de cristalización descritas en las bases de datos del Protein Data Bank (PDB) para BsFtsZ y SaFtsZ, con el objetivo de optimizar las condiciones más exitosas e intentar co-cristalizar estas proteínas con los ligandos seleccionados.

La proteína FtsZ sin ligando se cristalizó mezclando 2  $\mu$ L (20 mg/mL de FtsZ en tampón C) con 2  $\mu$ L de la solución reservorio e incubando a 14 y 25 °C. Las condiciones de cristalización de la literatura que dieron buenos resultados se ajustaron modificando la concentración de agente precipitante, la concentración de proteína, la temperatura de incubación, así como añadiendo distintos aditivos que facilitaran unas mejores condiciones de solubilidad (tanto para la proteína como para los compuestos) y utilizando reactivos de distintas casas comerciales. El éxito reproduciendo las condiciones descritas puede variar en cada caso, debido a varios factores: distinto grado de pureza de la muestra, tampón con el que se ha purificado la proteína, casa comercial de los reactivos usados para su cristalización, etc. Todas las condiciones que se probaron se describen a continuación (**Tabla 3**). Se empleó el método de difusión de vapor usando el método de gota colgante (**Figura 13**), y también se probó, aunque sin éxito, el método de difusión de vapor por gota sentada. Las gotas se prepararon sobre la superficie de cobre-objetos de 1 cm, se les dio la vuelta y se sellaron en las cámaras de los pocillos (placas de 24 pocillos) con el reservorio puro (1 mL). El sellado lo facilitaba el gel de silicona en los bordes de cada pocillo.

**Tabla 3. Condiciones empleadas para la cristalización.** Se muestran las condiciones empleadas con cada proteína (BsFtsZ y SaFtsZ). Todas estas condiciones se han probado tanto para la cristalización de la proteína sin y con ligandos. La primera fila de cada bloque se corresponde con las condiciones descritas en el PDB. Se muestran las modificaciones en cada uno de los sub-apartados (distintos precipitantes, tampones + aditivos, temperatura de cristalización, etc.).

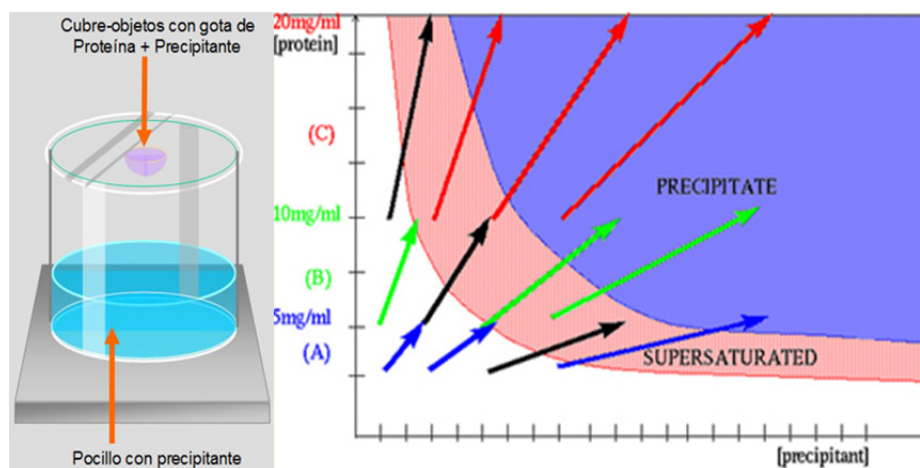
Proteína usada	Estructura de referencia	Fragmento (aá resueltos)	Precipitante	Tampones + aditivos	Temp. (°C)	Otros aditivos
BsFtsZ	2RHH	12-315	50% PEG200	0.1 M TRIS (pH=7.0) 50 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			30-55% PEG200	0.1 M BIS-TRIS (pH=6.5) 50 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			25-50% PEG200	- 50 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			25-50% PEG200	0.2 M BIS-TRIS (pH=6.5) 50 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			30-55% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3350	20/14/4	-
			30-55% PEG200	0.1 M BIS-TRIS (pH=6.5) 5% PEG3350	20/14/4	-
			20-30% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	-
			22-27% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	-
			22-27% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	0.2 M NaCl
			22-27% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	0.4 M NaCl
			22-27% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	0.6 M NaCl
			20-30% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	-
			20-30% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	0.15 - 0.3 M NaCl
			26-31% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	0.1 - 0.18 M NaCl
			20-30% PEG200	0.1 M MES (pH=6.0) 5% PEG3000	20/14/4	0.15 - 0.3 M NaCl

## MATERIALES Y MÉTODOS

			20-25% PEG200	0.1 M MES (pH=6.0) 5% PEG3000	20/14/4	0.3 - 0.6 M NaCl
			20-25% PEG200	0.1 M MES (pH=6.0) 5% PEG3000	14	0.3 - 0.6 M NaCl
			25-27% PEG200	0.1 M TRIS-HCl (pH=8.6) 5% PEG3000	20/14/4	0.1- 0.2 M NaCl
			20-30% PEG200	0.1 M BIS-TRIS (pH=6.5) 5% PEG3000	20/14/4	-
			26-31% PEG200	0.1 M TRIS (pH=8.6) 5% PEG3000	14/4	0.125 - 0.150 M NaCl
			50% PEG400	0.1 M Acetato (pH=4.5) 0.2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			35-60% PEG400	0.1 M Acetato (pH=4.5) 0.2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			25-50% PEG400	0.1 M BIS-TRIS (pH=6.5) 50 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			25-50% PEG550	0.1 M BIS-TRIS (pH=6.5) 50 mM Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
			30-55% PEG550 MME	0.1 M BIS-TRIS (pH=6.5) 5% PEG3350	20	-
<b>BsFtsZ</b>	<b>2RHJ</b>	12-315				
			30% PEG200	0.1 M MES (pH=6.0) 5% PEG3000	20	-
<b>BsFtsZ</b>	<b>2RHO</b>	12-315	30% PEG200	0.1 M MES (pH=6.0) 5% PEG3000	20	-
			15-20% PEG3350	0.1 M TRIS (pH=8.0) 0.2 M Kcitrato	20	-
<b>BsFtsZ</b>	<b>2VXY</b>	11-204/ 205-316	30-55% PEG3350	0.1 M TRIS (pH=8.0) -	20	-
			19% PEG3000	0.1 M TRIS (pH=9.0) 0.24 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	No probado	-
<b>BsFtsZ</b>	<b>2VAM</b>	12-204/ 205-315	17-22% PEG2000	0.1 M TRIS (pH=9.0) 0.24 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20	-
<b>SaFtsZ</b>	<b>3VO8</b>	392	30% PEG 4000	0.1M Tris-HCl (pH=8.5) 0.2 M Li <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25	-

El agua se evapora de la gota hasta igualar la osmolaridad que genera el ambiente salino. Esta deshidratación produce una lenta precipitación de proteínas que se concentran en la gota hasta alcanzar el equilibrio. Las proteínas van pasando por distintas condiciones de fase, que en determinados casos pueden llevar a la precipitación ordenada o bien a la

formación de precipitados amorfos, microcristales o cristales de mayor tamaño (McPherson y DeLucas, 1999). El crecimiento lento y ordenado da lugar a cristales de buen tamaño y geometría regular (no polimorfos), y esto sucede en la región definida como zona de nucleación del diagrama de fase (**Figura 13**). Los cristales crecieron en 24 horas, pero se dejaron un mínimo de 48 horas para ser recogidos con bucles de nylon de 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. La observación de los cristales se hizo con un microscopio óptico de polarización. El precipitante PEG, aporta propiedades crio-protectoras que facilitan la congelación de los cristales sin moléculas de agua que interfieran en la difracción, no obstante, en casos puntuales se empleó una mezcla de parafina y aceite mineral como agente crio-protector adicional para evitar la difusión de agua y proteger el cristal. El uso del agente crio-protector se intentó limitar, puesto que contribuye a reducir la resolución y puede afectar a la calidad de los datos obtenidos.



**Figura 13.** Izquierda. Método de difusión de vapor por gota colgante. ([www.xtal.iqfr.csic.es](http://www.xtal.iqfr.csic.es))

Derecha. Diagrama de la curva de solubilidad para el crecimiento de cristales. La región por encima de la curva de solubilidad es llamada zona sobresaturada (rosa). En la zona de nucleación (en morado) se produce la nucleación espontánea.

Los datos de difracción de rayos X se colectaron en distintas líneas (ID 30A, ID 30B, ID 23-1, BM14) del European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Francia). También se empleó la técnica de *soak-in* para la obtención de cristales con el complejo proteína-ligando. Esta técnica consiste en la adición en exceso de ligando (sólido o disuelto en DMSO) a los cristales de proteína previamente formados. La ventaja de este método es que la solubilidad del ligando no compromete la cristalización de la proteína, pero por

contra se puede dar que el sitio de unión en la proteína quede ocluido o poco accesible, debido al tipo de empaquetamiento cristalino, dificultando así la unión del ligando.

Los cristales obtenidos se llevaron a difractar a varias estaciones del European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) – Grenoble, ID30, ID29, ID14. Se recogieron sets de datos (difractogramas), cuya información se procesó a fin de poder resolver la estructura cristalográfica. El número de difractogramas por muestra, así como los ángulos a los que se tomaron las medidas fueron determinados por el Dr. Carlos Contreras-Martel. Se tomó en consideración el grupo espacial aparente propuesto por el programa en un primer barrido con medidas en cuatro ángulos aleatorios del cristal (distintos ángulos de las regiones más homogéneas escogidas para cada cristal), para después colectar el set de datos completo.

#### IV.6.3 Procesamiento de los datos y resolución de la estructura cristalográfica

Los sets de datos de difracción de rayos se indexaron y escalaron con XDS (Kabsch, 1993). La estructura se resolvió empleando la estructura de FtsZ (PDB ID: 2VXY), correspondiente a la FtsZ de *Bacillus subtilis* libre de nucleótido resuelta a 1.7 Å de resolución, en un modelo de aproximación por reemplazo molecular usando PHASER (Storoni y McCoy, 2004). En la primera resolución con los cristales sin ligando se encontraron los mismos grupos de espacio, todos ellos con el sitio de unión del GTP accesible. El programa COOT (Emsley y Cowtan, 2004; Buszek *et al.*, 2007; Emsley *et al.*, 2010) se utilizó para realizar las correcciones manuales del modelo. Se emplearon ciclos de refinamiento mediante REFMAC 5.5 (Murshudov *et al.*, 1997) implementado en la suite CCP4-6.3.0 (Murshudov *et al.*, 1997). Además, las moléculas de agua fueron añadidas al mapa de densidades electrónicas residuales utilizando ARP/ wARP (Cohen *et al.*, 2008). La calidad estereoquímica del modelo refinado se verificó con MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010) y PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) La estructura secundaria se asignó mediante DSSP (Kabsch, 1993) y STRIDE (Heinig y Frishman, 2004) Para la identificación de las interacciones proteína-ligando y para aquellas interacciones entre los aminoácidos se empleó LIGPLOT (Wallace *et al.*, 1995) y LigPlot+ (Laskowski y Swindells, 2011). Los datos de difracción de rayos X, la solución estructural del reemplazo molecular y la estadística de refinado pueden verse en la **Tabla 4**.



Tabla 4. Datos recogidos, reemplazo molecular y estadística de la estructura refinada

<b>Datos obtenidos:</b>	
Fuente de rayos-X	ID30A3
Detector	Pilatus3 2M
Longitud de onda (Å)	0.96770
Rango de escaneo (°)	360
Oscilación (°)	0.25
Grupo espacial	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<i>a</i> (Å)	71.52
<i>b</i> (Å)	97.25
<i>c</i> (Å)	115.62
Mosaicidad (°)	0.186
Resolución global (Å)	44.96-2.21
Nº reflexiones observadas/únicas	275804/38284
Alta resolución de celda (Å)	2.34-2.21
Compleitud (%) (última celda)	93.1 (83.2)
<i>R</i> <sub>sym</sub> (última celda)	3.0 (74.7)
<i>I</i> / <i>σ</i> ( <i>I</i> ) (última celda)	44.10 (3.03)
Factor B del gráfico Wilson (Å <sup>2</sup> )	63.23
<b>Reemplazamiento molecular:</b>	
Contenido de solvente (%)	51
Mol/ASU	2
Puntuaciones Phaser RZF/TZF	6/11, ++/18
Puntuaciones Phaser LLG	108, 348, 3822
<b>Refinado:</b>	
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%) Inicial	23.63/28.99
<i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%) Final	19.39/22.97
Desviación RMS, distancia de enlace (Å)	0.011
Desviación RMS, ángulos de enlace (°)	1.372
Media B-factor (Å <sup>2</sup> )	53.73
Nº de átomos de proteína	10949
Nº de moléculas de agua	154
Nº de sulfatos	2
Residuos mayoritarios en regiones más favorecidas/permitidas en el gráfico de Ramachandran (%)	100.0

## IV.7 Efecto de los compuestos en células bacterianas

### IV.7.1 Determinación de la actividad antibacteriana

La concentración mínima inhibitoria (MIC) de cada compuesto en el crecimiento celular bacteriano se determinó empleando el método para macrodiluciones en medio líquido CAMHB II siguiendo las directrices del "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI 2006), organismo sin ánimo de lucro que promueve el desarrollo e implementación de pruebas estándar de sensibilidad a antimicrobianos para laboratorios clínicos. La MIC se define como la concentración más baja de compuesto a la que se inhibe el crecimiento bacteriano tras 18 horas de incubación medido por absorbancia a 600 nm.

La MIC en las cepas de *B. subtilis* 168, *S. aureus* multiresistente a meticilina (MRSA) Mu50 (nivel de bioseguridad P2), *E. coli* (MG1655) y *E. Coli* permeabilizada EnvA1, se determinó como se describe a continuación, siguiendo el mismo procedimiento para todas las cepas. Se inocularon 10 mL de medio líquido CAMHB II con 100  $\mu$ L de un cultivo que se dejó crecer durante toda la noche. Se inocularon 100  $\mu$ L del cultivo crecido durante la noche en 10 mL de medio fresco CAMHB II y se dejó crecer hasta alcanzar una  $OD_{600} = 0.1$ . Este cultivo se diluyó 150 veces con medio fresco. Paralelamente se prepararon tubos de 13 mL con 250  $\mu$ L de medio CAMHB II fresco y el doble de la concentración deseada de los compuestos. Se emplearon *stocks* diluidos de los compuestos para no sobrepasar el umbral del 1 % total de DMSO en el cultivo (puede inhibir el crecimiento bacteriano a concentraciones altas), y se prepararon controles sin compuesto y con 1 % de DMSO. A cada uno de los tubos se le añadió 250  $\mu$ L del cultivo bacteriano diluido 150 veces, por lo que la concentración de compuesto quedó diluida a la mitad. Se emplearon condiciones de esterilidad en todo momento. Siguiendo las directrices estándar, las muestras se midieron por absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, tras 16 – 18 h de incubación en agitación (200 rpm) a 37 °C.

Para comprobar la estabilidad de los compuestos en el medio de cultivo a lo largo del tiempo, se incubaron con la cepa bacteriana ( $OD_{600} = 0.1$ ) durante más de 18 horas con el medio de cultivo correspondiente (CAMHB II, LB, Pensssey, Mueller-Hinton, etc.), y se tomaron alícuotas de 0.75 mL cada 1, 2, 4, y 18 horas. Los viales recogidos se centrifugaron para sedimentar las células bacterianas y se recogió el sobrenadante. Se añadió Taxol a 100  $\mu$ M como estándar interno en 0.5 mL de sobrenadante, se realizó una extracción de los

compuestos con 0.75 mL de acetonitrilo, y se secaron bajo una corriente de argón. Las muestras se reconstituyeron en metanol, se centrifugaron y se analizaron vía HPLC-MS. Las muestras se midieron mediante un análisis por monitorización selectiva de iones (SIM), y cada fracción se cuantificó midiendo el área bajo los picos, relativa al estándar interno.

Los ensayos con el resto de bacterias patógenas que se probaron en el proyecto de los compuestos UCM con el núcleo de bifenilo, se realizaron siguiendo un método de microdiluciones del medio CAMHB sólido (Oxoid, Basingstoke, UK). Los compuestos se probaron a concentraciones entre 0.12-128 mg /L, y se incubaron 24 horas a 35 – 37 °C. Los ensayos con microdiluciones del medio CAMHB sólido fueron realizados en el Center for Integrated Protein Science, del Departamento de Química de la Universidad Técnica de Múnich (Annabelle Hoegl, Matthew Nodwell y Stephan A. Sieber).

#### **IV.7.2 Estudio del fenotipo bacteriano y test de viabilidad celular**

La finalidad de este ensayo es la observación del efecto de los compuestos en la división celular bacteriana. Se dejó crecer un cultivo de *B. subtilis* 168 en CAMHB II hasta una  $OD_{600} = 0.1 - 0.2$ . Se prepararon viales de las células de 500  $\mu$ L y se incubaron a 37 °C en agitación en presencia de los compuestos a las concentraciones deseadas. Pasadas 3 h de incubación, se pipetearon 10  $\mu$ L de cada vial en un portaobjetos, se tapó el contenido con un cubreobjetos y se visualizaron las células por contraste de fases con el microscopio Zeiss Axioplan, con el objetivo 40 x (Plan-Neofluar). La longitud celular se midió con el programa ImageJ (Schindelin *et al.*, 2012), analizando el tamaño de las células en distintas imágenes. Las medidas se analizaron descartando previamente aquellas medidas que se desvían estadísticamente de la tendencia general (error estándar). Para poder visualizar nucleóide y membrana se añadieron, al final de la incubación del cultivo, 0.25  $\mu$ g/mL de 4,6-diamino-2phenylindole (DAPI) y 1  $\mu$ g/mL de FM4-64. El objetivo utilizado es el 100 x (Plan Aplanachromatic) y las fotos se tomaron con una cámara digital Orca-Flash 4.0 CMOS (Hamamatsu C11440). Se usó agarosa al 2 % para inmovilizar las células.

Para estudiar la viabilidad celular, se repitió este ensayo y 10  $\mu$ L de cada vial se incuban con 5  $\mu$ L de cada uno de los stocks A y B del kit comercial L13152 *LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit* (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies). Este kit utiliza

una mezcla de colorante A (*SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain*) y colorante B (*red-fluorescent nucleic acid stain propidium iodide*). El colorante A, penetra en el interior de la célula aunque no se haya comprometido la integridad física de la membrana. El colorante B, sólo tiñe el interior celular cuando la membrana está dañada y las células han quedado permeabilizadas. Se realizó un conteo del número de células vivas y muertas en cada muestra mediante su visualización por microscopía de fluorescencia (microscopio Zeiss Axioplan, con el objetivo 100x Plan Apochromatic).

#### IV.7.3 Estudio de la localización celular del anillo Z

El efecto en la localización celular de FtsZ, de aquellos compuestos que mostraron efecto filimentando las células de *B. subtilis* 168, se estudió en la cepa modificada de *B. subtilis* SU570 (168 rpcC2 ftsZ::FtsZ-gfp-Spec (Levin *et al.*, 1999; Strauss *et al.*; 2012)) cuya FtsZ nativa ha sido reemplazada por una FtsZ fusionada a GFP. Esta cepa ha sido facilitada por la doctora Elisabeth J. Harry del Instituto de Biociencias Médicas y Moleculares de Australia. Cabe destacar que esta cepa es más sensible a la inhibición vía FtsZ que la cepa silvestre (*B. subtilis* 168), por lo que las concentraciones de cada compuesto probadas fueron, en general, inferiores a las que se probaron en el estudio de la morfología celular. Se inocularon 10 mL de medio fresco Penassay Antibiotic Broth (PAB, Becton Dickinson) con 100 µL de un cultivo de *B. subtilis* SU570 en fase estacionaria crecido durante 16-18h a 30°C con 50 µg/mL de espectinomicina. A este nuevo cultivo se le añadió la misma concentración de antibiótico, y se dejó crecer hasta una  $OD_{600} = 0.1 - 0.2$ . Se tomaron alícuotas de 500 µL que se incubaron con los compuestos a las concentraciones escogidas durante 1.5 h. Pasado este tiempo se tomaron 10 µL de cada muestra y se añadió 0.25 µg/mL de 4,6-diamino-2phenylindole (DAPI) y 1 µg/mL de FM4-64, para poder visualizar nucleóide y membrana, respectivamente, en el microscopio de fluorescencia (Zeiss Axioplan).

#### IV.7.4 Inmunofluorescencia en células bacterianas

Para producir anticuerpos anti-FtsZ de conejo se utilizó el péptido sintético SVPKREPKREEPQQ de la secuencia 340–353 de la FtsZ de *B. subtilis* (producido por Genscript). Las células de *B. subtilis* 168 se trataron con los compuestos durante 3h y se fijaron con metanol a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 1 h. A continuación se permeabilizaron las células con lisozima y se tiñeron como se ha descrito anteriormente, con DAPI y FM4-64. Los anticuerpos anti-FtsZ se añadieron a una dilución 1:500 y se incubaron durante toda la noche a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El anticuerpo secundario empleado (anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con Alexa488, de Sigma) se añadió a una dilución 1:10000 y se incubaron durante 1 hora a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Los cubreobjetos se montaron con 50% de glicerol en tampón PBS.

#### IV.8 Efecto de los compuestos en líneas celulares humanas

Se evaluó el efecto citotóxico de los compuestos en varias líneas celulares humanas. También se quiso observar cómo se comportan los compuestos en la red de microtúbulos y su efecto en los núcleos celulares. Estos experimentos fueron realizados por la Dra. Isabel Barasoain, del laboratorio de Agentes Estabilizantes de Microtúbulos del CIB.

##### IV.8.1 Ensayo de citotoxicidad

Las células de cada una de las líneas celulares empleadas se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de entre 12000 y 16000 células por pocillo (dependiendo de la línea celular empleada) en 80  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo. Al día siguiente se añadieron otros 20  $\mu\text{L}$  de medio con diluciones seriadas de ligando cubriendo un amplio rango de concentraciones y se incubaron durante 48 h. A continuación se realizó el ensayo de MTT (ensayo de viabilidad colorimétrico que se basa en la reducción enzimática de la molécula MTT a formazán en células viables, detallado en Barasoain *et al.*, 2010), con alguna modificación:

se añadieron 20  $\mu$ L de MTT (2.5 mg/mL a cada pocillo y las placas se incubaron durante 4 horas a 37 °C. Posteriormente se detuvo la reacción añadiendo 100  $\mu$ L de solubilizador de MTT (10 % SDS, 45 % DMF, pH 5.5). Las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche para disolver los precipitados de formazán y se midió la absorbancia de cada pocillo a  $\lambda = 595$  y 690 nm con un lector de placas Appliskan (Thermo). Los blancos usados fueron pocillos sin células y los controles de crecimiento fueron pocillos con células que contenían la misma proporción de DMSO presente en los pocillos con compuesto. Las concentraciones inhibitorias 50 (IC50, concentración de ligando a la que se observa una inhibición del 50 %) en la proliferación celular se calcularon de la curva dosis-respuesta y se expresaron como media y error estándar de varios experimentos independientes.

#### IV.8.2 Ensayo de inmunofluorescencia indirecta

Para determinar el efecto de los compuestos sobre la red de microtúbulos y su efecto en los núcleos, se sembraron las células a una densidad de 150000 células por mL en placas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro durante toda la noche. Pasadas 12 horas, se añadió el ligando de interés a diferentes concentraciones o el volumen equivalente de DMSO (cantidad residual de DMSO menor del 0.5 %) y se incubaron las células durante 24 horas. Para evitar perder las células despegadas, las placas se lavaron con PEMP (tampón PEM + 4 % de PEG) mediante centrifugación (centrífuga Sorvall GIC4 con rotor H1000 flotante, a 12000 rpm, 5 minutos y 25 °C) y las células en los cubres se permeabilizaron durante 90 segundos con 0.5 % de Tritón X-100 en PEM y se fijaron con 3.67 % de formaldehído en PEM durante 30 minutos, tal y como ha sido descrito en de Ines *et al.*, 1994. Después de lavar con PBS, las células se incubaron con el anticuerpo monoclonal anti  $\alpha$ -tubulina DM1A a una dilución 1/400 en PBS con BSA 3 % durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual se lavaron dos veces en PBS y se incubaron durante 1 hora más con el anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón (marcado con FITC, a una dilución 1/200 en PBS con BSA 3%). Los cubreobjetos se lavaron en PBS y el ADN se tiñó con 10  $\mu$ g/mL de Hoechst 33342 en PBS durante 30 minutos. Las muestras se examinaron y se fotografiaron usando el microscopio de epifluorescencia Zeiss Axioplan.

## IV. RESULTADOS





## RESULTADOS

FtsZ presenta un ensamblaje dinámico asociado a la hidrólisis del GTP (Mukherjee y Lutkenhaus, 1998). Durante el ensamblaje de los monómeros de FtsZ en polímeros, el dominio de activación de la actividad GTPasa de uno de los monómeros contacta con el sitio de unión del nucleótido de la subunidad de abajo, formando así el bolsillo catalítico.

Previamente, en nuestro grupo se ha demostrado la posibilidad de inhibir selectivamente, con pequeñas moléculas sintéticas que reemplazan al GTP unido, la actividad de FtsZ y, como consecuencia, la división celular bacteriana (Ruiz-Avila *et al.*, 2013).

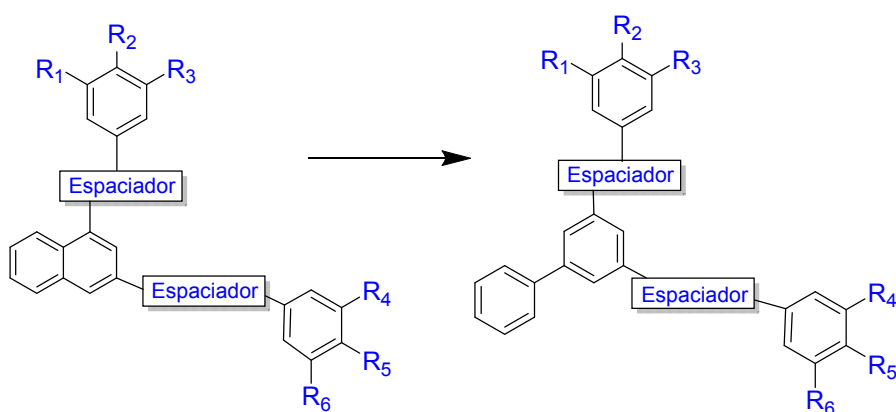
Como objetivo de esta Tesis, se quiso continuar con la búsqueda de nuevos inhibidores selectivos de FtsZ, con afinidad por el sitio de unión del nucleótido pero con una estructura química distinta al GTP. Para ello se plantearon distintos enfoques: 1) Optimización de inhibidores previamente descritos (compuestos UCM) mediante modificaciones sintéticas de los mismos, que fueron realizadas en colaboración con el grupo de Química Médica de la Facultad de Química de la Universidad Complutense de Madrid (UCM); 2) Búsqueda de nuevos compuestos mediante técnicas de cribado virtual en las que se seleccionaron aquellos compuestos que, predictivamente, se unen al sitio del GTP en FtsZ. Este proyecto se realizó en colaboración con el grupo de Bioinformática del Instituto de Química-Física Rocasolano (IQFR) del CSIC; y 3) Estudio de moléculas sintéticas descritas previamente en la literatura como inhibidores de FtsZ pero cuyo sitio de unión en la proteína se desconoce.

### IV.1 Optimización de compuestos derivados de bifenilo

#### IV.1.1 Punto de partida

La base de este proyecto parte de los resultados positivos obtenidos en este laboratorio durante la tesis doctoral de la Dra. Laura Ruíz-Ávila, en los que se demostró que compuestos polifenólicos con un núcleo central de naftaleno son capaces de unirse al sitio del nucleótido en BsFtsZ. Estos compuestos se seleccionaron mediante un cribado virtual

de la quimioteca del grupo de Química Médica de la UCM. Inicialmente se seleccionaron los 18 compuestos con la mejor puntuación en el ajuste dirigido para el sitio de unión del GTP en BsFtsZ, y cuya optimización se llevó a cabo mediante la síntesis de varios análogos. Entre los compuestos resultantes, los compuestos UCM44 y UCM53 fueron los que dieron los mejores resultados tanto en afinidad de unión por el sitio del GTP en BsFtsZ ( $K_{d_{UCM44}} = 0.7 \pm 0.1 \mu M$  y  $K_{d_{UCM53}} = 0.8 \pm 0.2 \mu M$ ), como en actividad antibacteriana en *B. subtilis* (MIC UCM44: 25  $\mu M$ , MIC UCM53: 13  $\mu M$ ) y en *S. aureus* MRSA (MIC UCM44: 22  $\mu M$ , MIC UCM53: 4.7  $\mu M$ ) (Ruiz-Avila *et al.*, 2013).



**Figura 14. Estructuras de los compuestos de la serie anterior y de la nueva.** Izquierda, primera serie de compuestos sintetizados, con núcleo de naftaleno. Derecha, compuestos con un cambio del núcleo central por un bifenilo, que da lugar a la nueva serie de análogos. Los radicales de los anillos de galato y los espaciadores entre los anillos (en azul) representan todas las partes en las que se han realizado modificaciones y que están representadas en la **Tabla 5**.

El siguiente objetivo fue la optimización de estos inhibidores, para mejorar la afinidad de unión al sitio del nucleótido y la actividad antimicrobiana manteniendo la especificidad frente a FtsZ. Se optó por realizar modificaciones químicas en las tres subunidades susceptibles de modificación: el esqueleto central de naftaleno, los espaciadores (ésteres) y los anillos de galato. En estos compuestos con el núcleo de naftaleno, se observó que una reducción en el número de grupos hidroxilo en los anillos de galato mejoraba significativamente la afinidad de unión a FtsZ. Los compuestos UCM61 ( $K_{d_{UCM61}} = 0.7 \pm 0.2 \mu M$ , MIC en *B. subtilis* 168: 20  $\mu M$ ; MIC en *S. aureus* MRSA: 10  $\mu M$ ) y UCM62 ( $K_{d_{UCM62}} = 0.8 \pm 0.2 \mu M$ , MIC en *B. subtilis* 168 y en *S. aureus* MRSA: 5  $\mu M$ ), del trabajo anterior (Artola *et al.*, 2015), fueron los mayores exponentes de este cambio, con un total de tres y dos grupos hidroxilo, respectivamente. La sustitución de esos grupos hidroxilo por grupos metoxi no mejoraba la afinidad de unión al sitio. UCM62 (3-[(4-hidroxibenzoil)oxil]-1-naftil

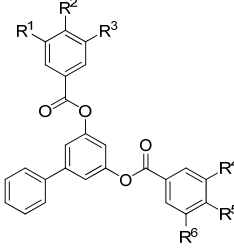
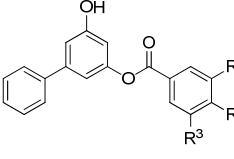
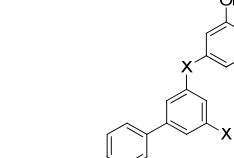
3-hidroxibenzoato) resultó ser el mejor compuesto tanto por su afinidad de unión a FtsZ como por su actividad antibacteriana. En el esqueleto central se cambió el grupo naftaleno por tetrahidroxinaftaleno, bifenilo, fenilo, ciclohexano y etilo. La sustitución por un núcleo bifenilo (compuesto UCM64), resultó ser la más efectiva puesto que mejoraba significativamente tanto la actividad antibacteriana como la afinidad por el sitio de unión en la proteína (MIC en *B. subtilis*: 40  $\mu$ M;  $K_{d_{UCM64}} = 0.8 \pm 0.1 \mu$ M) en comparación con el compuesto equivalente pero con el núcleo de naftaleno, UCM05 (MIC en *B. subtilis*: 100  $\mu$ M;  $K_{d_{UCM05}} = 2.3 \pm 0.1 \mu$ M) (Artola *et al.*, 2015) (**Figura 14**).

#### IV.1.2 Afinidad de unión por el sitio del GTP en BsFtsZ y actividad antibacteriana

En esta Tesis se han probado los compuestos con modificaciones estructurales en las regiones descritas como susceptibles (espaciadores y grupos hidroxilo de los anillos de galato), pero manteniendo el grupo bifenilo como núcleo central puesto que se había observado que mejoraba la afinidad por su sitio de unión en BsFtsZ con respecto a la serie de compuestos que tenían un grupo naftaleno como núcleo central (**Figura 14, Derecha**).

Se ha estudiado cómo afectaban las modificaciones a la afinidad de unión a FtsZ, mediante el ensayo de desplazamiento de la sonda *mant*-GTP, y a la actividad antibacteriana. Las modificaciones que se han realizado han sido las siguientes: la eliminación de los grupos hidroxilo en distintas posiciones del anillo (UCM78, UCM79, UCM81, UCM83, UCM92, UCM93), la eliminación de uno de los anillos de galato y su espaciador (UCM80, UCM82, UCM91 y UCM94) y la sustitución del espaciador por grupos amida (UCM95, UCM97), sulfonamidas (UCM98) o su eliminación (UCM96) (**Tabla 5**). Anteriormente se había probado, en compuestos con el núcleo de naftaleno, la sustitución del espaciador por un grupo etileno (UCM73) que no resultó ser un cambio favorable para la afinidad por la diana, por lo que se descartó este cambio en esta nueva serie de inhibidores.

**Tabla 5.** Afinidad a FtsZ y actividad antibacteriana de los compuestos derivados de bifenilo.

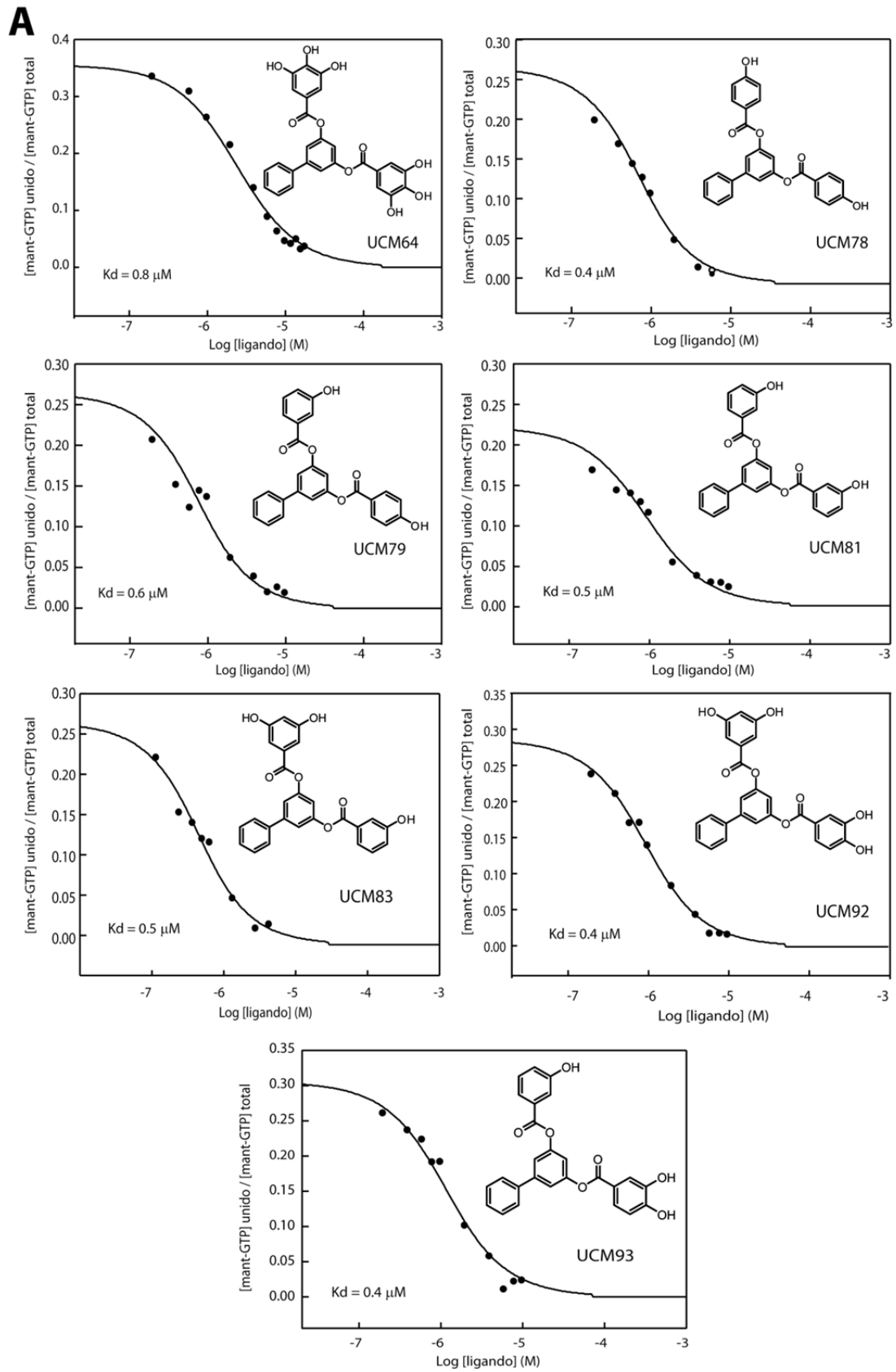
Compuesto	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	R <sup>5</sup>	R <sup>6</sup>	K <sub>d</sub> <sup>a</sup> FtsZ (μM)	MIC <sup>b</sup> (μM)		
								<i>B. Subtilis</i>	MRSA <sup>c</sup>	
	UCM64	OH	OH	OH	OH	OH	0.8 ± 0.1	40	50	
	UCM78	H	OH	H	H	OH	0.4 ± 0.1	2.5	5	
	UCM79	OH	H	H	H	OH	0.6 ± 0.2	10	5	
	UCM81	OH	H	H	OH	H	0.5 ± 0.1	5	7	
	UCM83	OH	H	OH	OH	H	0.5 ± 0.1	5	5	
	UCM92	OH	OH	H	OH	H	OH	0.4 ± 0.1	15	50
UCM93	OH	OH	H	OH	H	H	0.4 ± 0.1	15	50	
	UCM80	H	OH	H	-	-	3.3 ± 0.6	50	50	
	UCM82	OH	H	H	-	-	3.8 ± 1.3	50	50	
	UCM91	OH	H	OH	-	-	5.3 ± 1.0	50	50	
	UCM94	OH	OH	H	-	-	5.3 ± 1.0	75	50	
	Compuesto						X	K <sub>d</sub> <sup>a</sup> (μM) FtsZ	MIC <sup>b</sup> (μM)	
									<i>B. Subtilis</i>	MRSA <sup>c</sup>
	UCM95						NHCO	4.3 ± 1.5	25	50
	UCM96						-	0.5 ± 0.1	5	3
	UCM97						CONH	8.3 ± 1.4	50	50
UCM98						NHSO <sub>4</sub>	4.8 ± 0.5	50	50	

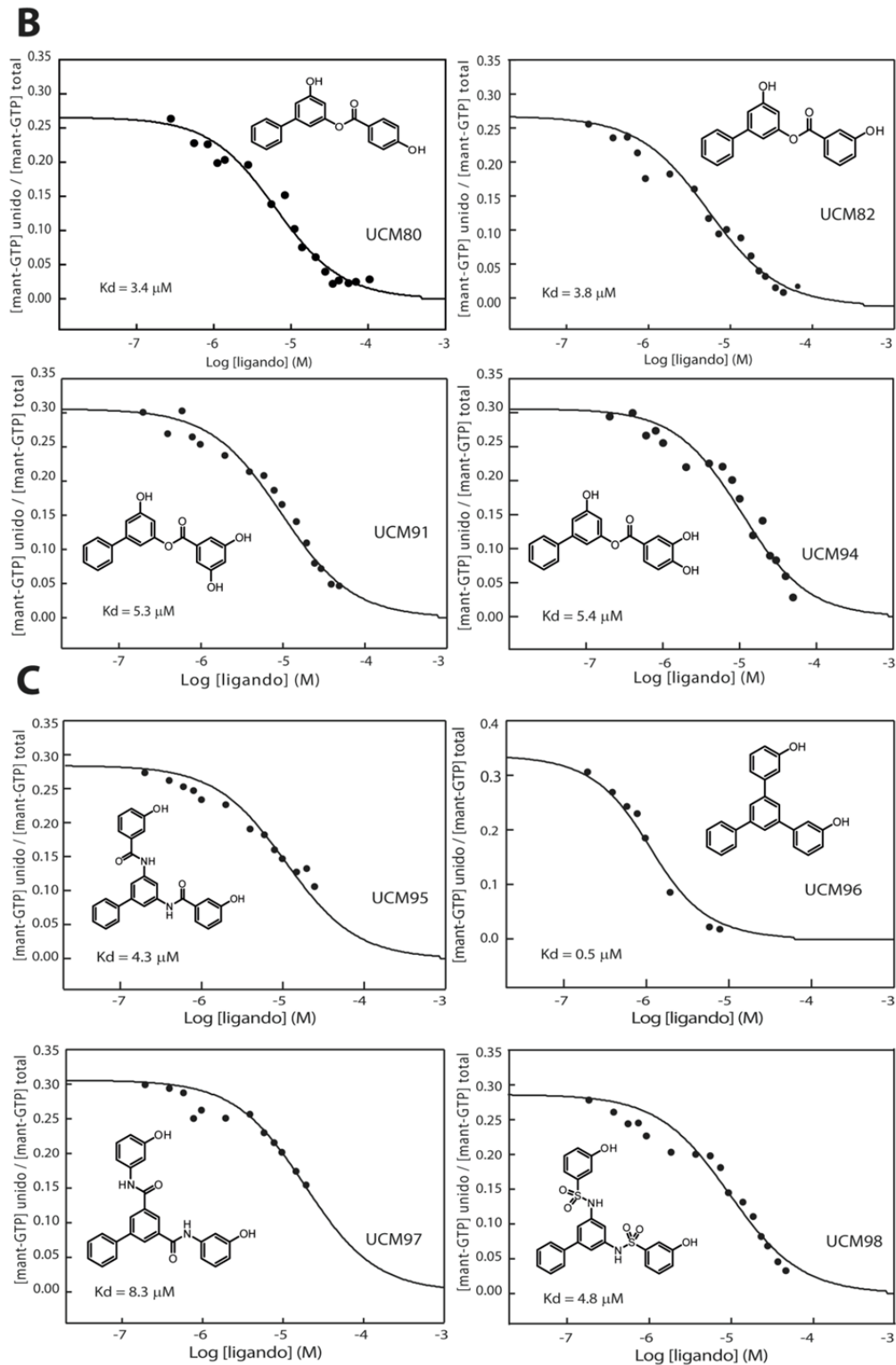
<sup>a</sup> Media ± error estándar (SEM) de los distintos ajustes de los resultados obtenidos. <sup>b</sup> Concentración mínima de compuesto en la que se inhibe el crecimiento bacteriano (MIC). <sup>c</sup> Cepa de *S. aureus* que ha adquirido resistencia a meticilina ATCC Nr: BAA-1556 (Institute Pasteur, France) MRSA USA300.

Se comprobó que todos los compuestos desplazan a la sonda del sitio de unión del GTP en BsFtsZ, en algunos casos con afinidades submicromolares (**Figura 15, Tabla 5**). Este hallazgo confirma que un grupo bifenilo en el eje central de los ligandos otorga más afinidad de unión a la proteína que el núcleo de 3,5-naftaleno. En base a los resultados obtenidos se determinó que, además, un grupo hidroxilo en cada uno de los anillos de galato optimiza la afinidad por el sitio de unión, sin observarse diferencias significativas según la disposición de estos en cada uno de los anillos, tal y como se había comprobado con la serie anterior de ligandos con el núcleo central 3,5-naftaleno. No obstante, se observó que la solubilidad de dichos compuestos en el tampón experimental disminuye con la reducción en el número de hidroxilos, lo que podría suponer una desventaja para su optimización y desarrollo farmacológico.

Después de estudiar la eliminación de los grupos OH en los anillos externos, se quiso ver cómo afectan los cambios en los espaciadores sobre uno de los mejores compuestos resultantes, el UCM81. Se observó que la eliminación del grupo espaciador (compuesto UCM96, **Tabla 5**) mantiene la afinidad por el sitio de unión (con una  $K_d$  aparente =  $0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) con respecto a UCM81 ( $K_d = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ). Sin embargo, los cambios del grupo éster como espaciador por grupos amida (UCM95, UCM97) o sulfonamida (UCM98) disminuyen significativamente las afinidades de unión, aunque los valores de la  $K_d$  aparente se mantienen en el orden submicromolar (**Tabla 5, Figura 15**). No obstante, el grupo éster es fácilmente hidrolizable, por lo que estos cambios sí podrían suponer una ventaja para estos inhibidores en relación a su posible desarrollo como fármacos, puesto que podrían aumentar su tiempo de vida medio.

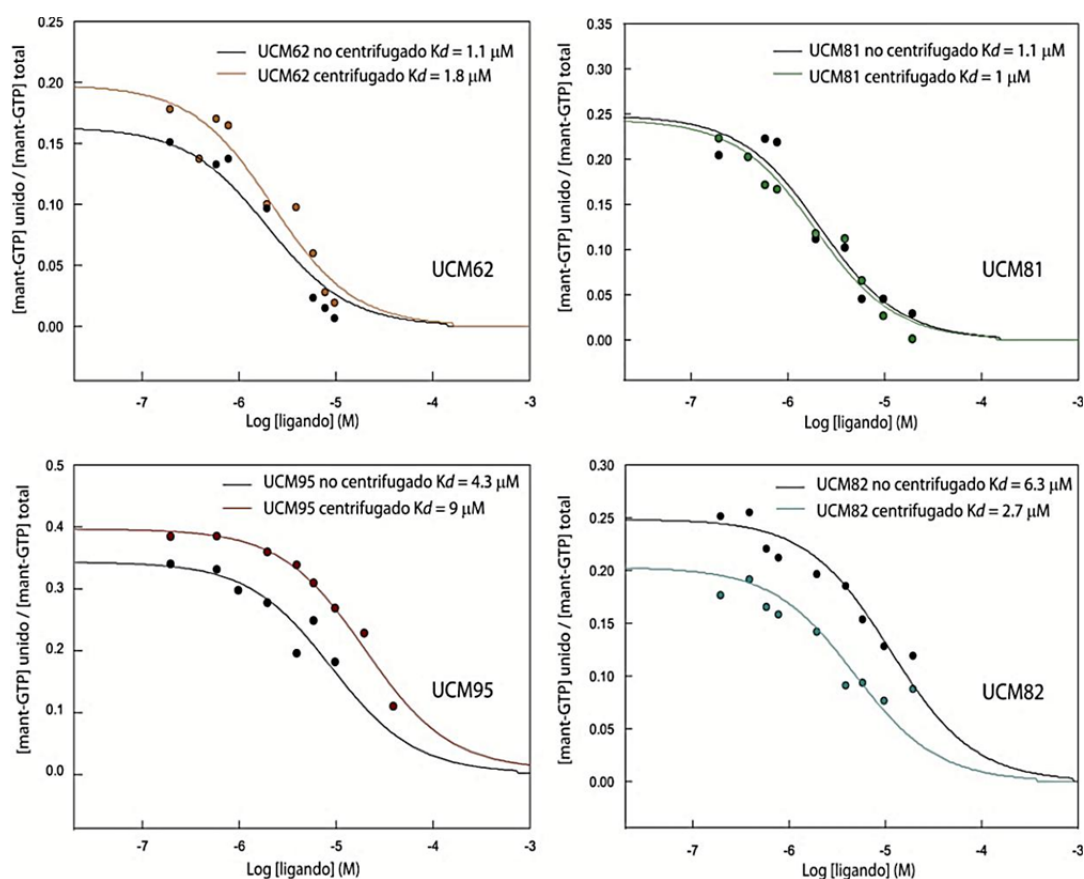
De todos los compuestos probados, los ligandos del primer grupo que se muestran en la **Tabla 5** (UCM64 – UCM93) y el ligando UCM96, del tercer grupo, son los que han dado mejores resultados de afinidad por el sitio de unión de GTP en la proteína, así como los mejores valores de inhibición bacteriana, tanto en la cepa de *B. subtilis* 168 como en *S. aureus* USA300 (MRSA). Al analizar en detalle los resultados de actividad antibacteriana en ambas cepas Gram-positivas (**Tabla 5**), los datos sugieren que la reducción en el número de hidroxilos en los anillos de galato de los distintos compuestos probados contribuye favorablemente a inhibir el crecimiento bacteriano, hecho que ya se sugirió en base a los resultados obtenidos con los compuestos de la anterior serie con el naftaleno como núcleo central.





**Figura 15.** Curvas de desplazamiento del *mant*-GTP del sitio de unión del nucleótido en BsFtsZ por los derivados de bifenilo. Se muestran clasificados en 3 grupos distintos según modificaciones: **A.** Cambios en los grupos hidroxilo en los anillos de galato. **B.** Eliminación de uno de los anillos de galato y su espaciador. **C.** Eliminación o sustitución del espaciador por grupos amida, o sulfonamida. Ensayos realizados con 750 nM de BsFtsZ en tampón Hepes, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 nM de *mant*-GTP, 2% de DMSO y concentraciones crecientes de ligando.

Con el objetivo de descartar que las medidas del desplazamiento de la sonda se deban a la formación de agregados proteína-ligando por unión inespecífica, se repitió el ensayo después de centrifugar la proteína incubada con los compuestos a distintas concentraciones. Las muestras se centrifugaron a 38.000 g durante 20 minutos, se realizó el ensayo de desplazamiento de la sonda fluorescente con el sobrenadante y se comparó con el desplazamiento obtenido antes de centrifugar. Los resultados de este experimento no muestran un cambio moderado en los valores de anisotropía de la sonda con las muestras antes y después de centrifugar, por lo que los valores de afinidad obtenidos en ambos ensayos no difieren mucho (**Figura 16**).



**Figura 16. Desplazamientos del *mant*-GTP del sitio del nucleótido en BsFtsZ antes y después de centrifugar las muestras.** Se muestran algunos de los ligandos de la serie, antes y después de centrifugar las muestras a 100.000 rpm durante 20 minutos a 25 °C. Se muestra el ajuste de los datos experimentales y las constantes de afinidad calculadas en ambos casos.



#### IV.1.3 Relación entre la afinidad de unión a FtsZ y la actividad antibacteriana de los compuestos

Las constantes de desplazamiento determinadas (**Tabla 5** y **Figura 15**), junto con los datos de las MIC obtenidos en las cepas de *B. subtilis* y *S. aureus* (**Tabla 5**) permitieron correlacionar ambas medidas en un estudio de la relación afinidad - actividad antibacteriana. Dicho análisis permitió identificar y clasificar sistemáticamente las distintas modificaciones químicas realizadas para poder identificar cuáles de ellas aportan mayor especificidad por nuestra diana. Los mejores compuestos de la serie se posicionan en el margen superior derecho de esta correlación (**Figura 17**). Es importante destacar que, en la mayoría de los casos, existe una correlación entre la afinidad de los compuestos por la diana y su efecto antibacteriano en ambas cepas (*B. subtilis* y *S. aureus*). Este tipo de correlación ha sido empleada con éxito en otros estudios. Son ejemplos de ello la predicción de la inhibición del crecimiento de células tumorales por epotilonas, y la selección de estabilizantes de microtúbulos a partir de sus afinidades de unión para su uso como agentes antitumorales (Buey *et al.*, 2005).

A partir del estudio de afinidad frente a actividad antibacteriana, se escogieron los mejores inhibidores de la serie y se probaron frente a las cepas patógenas *Enterococcus faecalis*, *Listeria Monocytogenes* y otra cepa de *S.aureus* Mu50 (también MRSA) (**Tabla 6**). De entre los cuatro fragmentos de bifenilo con un solo anillo de galato (UCM80, UCM82, UCM91 y UCM94) se incluyó en este ensayo sólo a dos de ellos (UCM82 y UCM91), debido a la similitud en afinidad y MIC entre ellos.

El perfil microbiológico de estos compuestos ha dado como resultado que la mayoría de ellos inhiben el crecimiento de bacterias patógenas Gram-positivas (*S. aureus* MRSA y *L. monocytogenes*). Los ligandos UCM62, UCM78, UCM79, UCM81, UCM83 y UCM96 son los que presentan MICs más bajas, entre 3 y 7  $\mu\text{M}$ , y los ligandos UCM64 (bifenilo parental), UCM82, UCM91, UCM92, UCM95, UCM97 y UCM98 inhibieron el crecimiento bacteriano a concentraciones más altas (50  $\mu\text{M}$ ). El compuesto UCM93 fue el único que no mostró efecto en la cepa de *L. monocytogenes* por debajo de 100  $\mu\text{M}$ , pero sí inhibición del crecimiento de la cepa de *S. aureus* MRSA, aunque también a una concentración alta (50  $\mu\text{M}$ ). No obstante, sólo los compuestos UCM62 (serie naftaleno), UCM78, UCM79, UCM81, UCM82 (fragmento con un solo anillo de galato), UCM83, UCM92, UCM93 y UCM97 (espaciadores CONH) dieron resultados positivos en inhibición del crecimiento de

la cepa *Enterococcus faecalis*, siendo UCM97 el que presenta la MIC más baja (10  $\mu$ M) (Tabla 6). Estos compuestos también se probaron en un ensayo de sedimentación de polímeros para determinar el porcentaje de inhibición de la polimerización de tubulina y BsFtsZ (Tabla 6). Estos últimos resultados se comentan en detalle en el siguiente apartado.

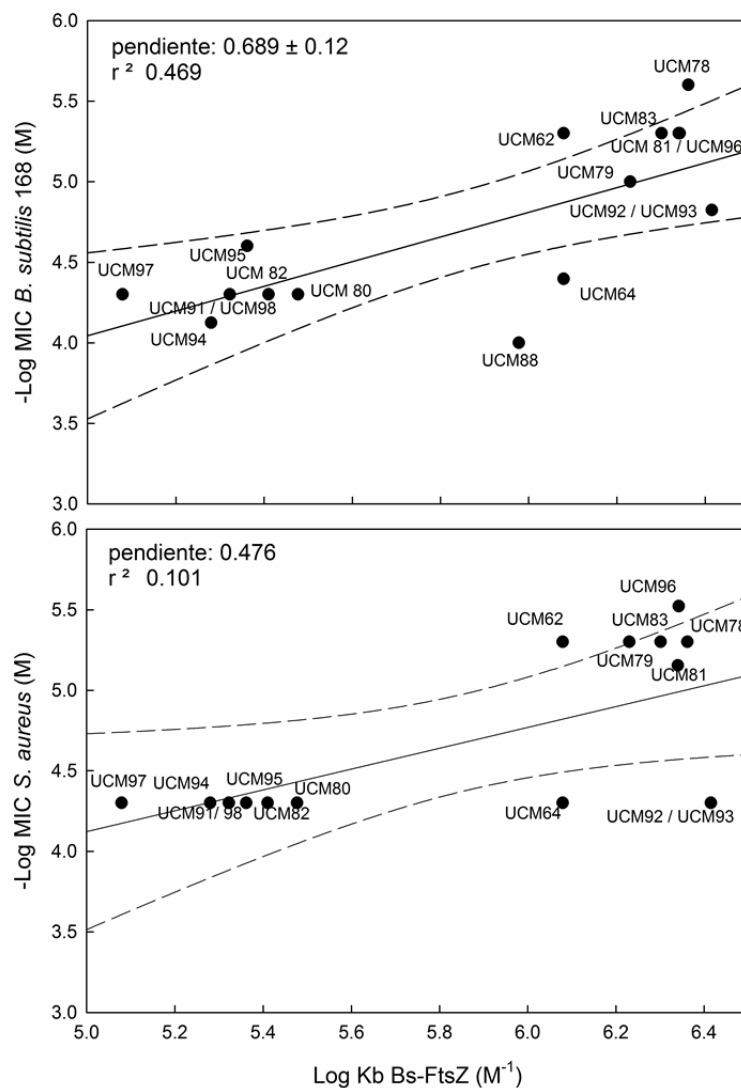


Figura 17. Relación entre la afinidad de los compuestos por BsFtsZ y la actividad antibacteriana en las cepas de *B. subtilis* 168 y *S. aureus* (MRSA). En ambos gráficos se muestra el coeficiente de correlación y la pendiente. La línea sólida se corresponde al ajuste lineal por mínimos cuadrados y las líneas discontinuas al intervalo de confianza del 95%.

Tabla 6. Resultados de actividad antibacteriana y resultados de inhibición de FtsZ y Tubulina *in vitro*.

Compuesto	MIC (μM)			Inhibición de FtsZ a 25 μM <sup>d</sup> (%)	Inhibición de Tubulina a 100 μM <sup>d</sup> (%)
	MRSA	<i>E.</i>	<i>L.</i>		
	Mu50 <sup>a</sup>	<i>faecalis</i> <sup>b</sup>	<i>monoc.</i> <sup>c</sup>		
UCM05	5	50	5	21	24
UCM64	50	>100	50	16	1
UCM78	5	50	5	12	0
UCM79	5	50	5	25	0
UCM81	7	50	7	36	0
UCM82	50	50	50	65	48
UCM83	5	50	7	48	35
UCM91	50	100	50	26	1
UCM92	50	50	50	33	1
UCM93	50	50	>100	21	5
UCM95	50	>100	50	56	13
UCM96	3	>100	5	55	8
UCM97	50	10	50	75	0
UCM98	50	>100	50	70	78

<sup>a</sup> *Staphylococcus aureus* Mu50/ATCC 700699 resistente a meticilina, ampicilina y kanamicina (Institute Pasteur, France). <sup>b</sup> *Enterococcus faecalis*, V583 ATCC700802, resistente a gentamicina y vancomicina (cepa secuenciada). <sup>c</sup> *Listeria monocytogenes*, EGDe (cepa secuenciada). <sup>d</sup> Inhibición del ensamblaje de la FtsZ purificada (error estándar ± 8%) y Tubulina (error estándar ± 9%) determinado mediante ensayos de sedimentación (ver apartado **Materiales y métodos**).

Los compuestos de la nueva serie de derivados de bifenilo no presentaron actividad antibacteriana en Gram-negativas a la máxima concentración probada (MIC >100  $\mu$ M), a pesar de que el primer compuesto sintetizado de esta serie (UCM64) mostró una moderada actividad bactericida en las cepas resistentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* (MIC = 50  $\mu$ M). Esto parece indicar que la reducción en el número de hidroxilos en los anillos tiene un efecto contraproducente en cuanto a su actividad antibacteriana en Gram-negativas.

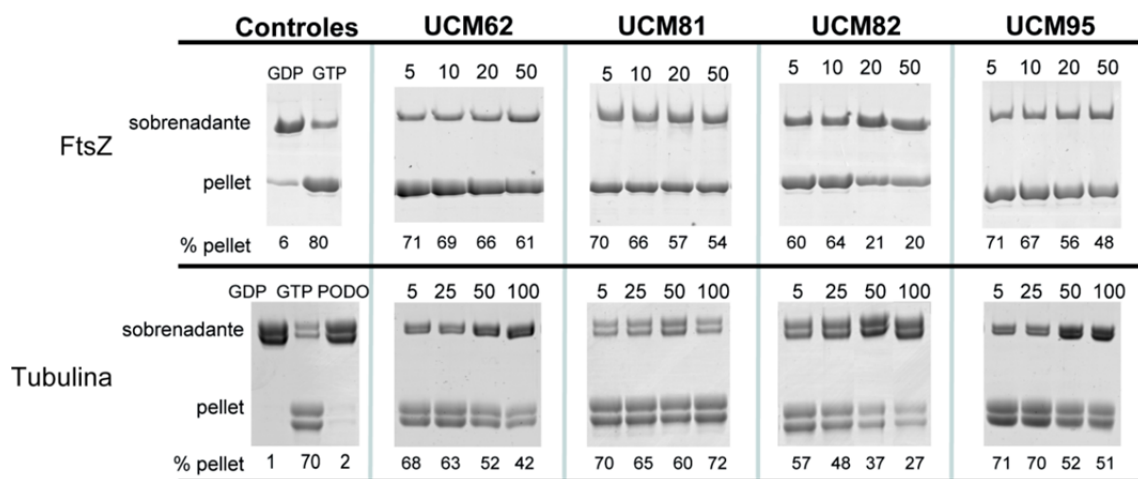
Se quiso determinar la estabilidad de estos compuestos en los ensayos con bacterias, para lo que se eligieron algunos de los ligandos más representativos (UCM78, UCM80, UCM81, UCM82, UCM95 y UCM96). Se incubaron en cultivos bacterianos y después de 18 horas se analizaron mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (HPLC-MS), dando como resultado que estos compuestos no son hidrolizados, obteniéndose más de un 90 % del compuesto inicial en todos los casos analizados.

#### IV.1.4 Inhibición del ensamblaje de FtsZ y selectividad frente a tubulina

Dado que el enfoque de este proyecto es la obtención de ligandos con potencial desarrollo farmacológico, es importante que no exista efecto cruzado con tubulina. Para descartarlo se comparó el efecto de los compuestos en la polimerización de FtsZ y tubulina. Estos compuestos se probaron a la concentración máxima soluble determinada en presencia de cada proteína (FtsZ a 25  $\mu$ M y tubulina a 100  $\mu$ M) (**Tabla 6**) y en presencia de un sistema de regeneración de GTP (SR): 15 mM de acetil fosfato, 1 unidad / mL de acetato quinasa.

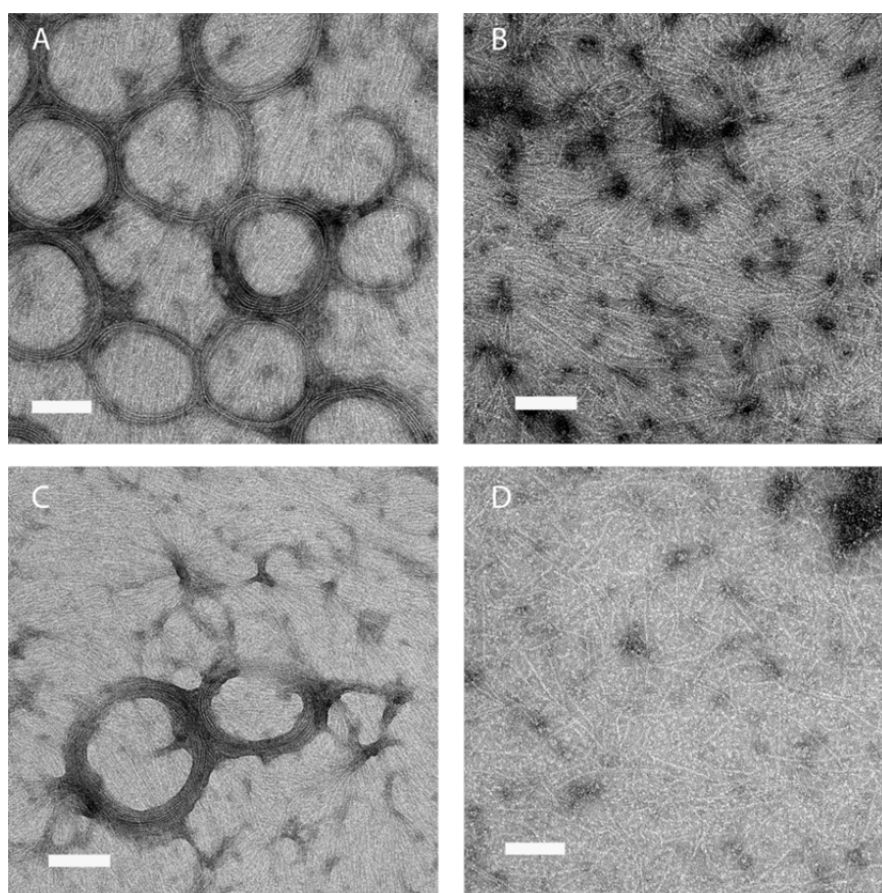
En comparación con los compuestos parentales de ambas series UCM05 y UCM64, se observó que esta nueva serie de compuestos mejora la inhibición de BsFtsZ, siendo UCM82, y los compuestos que van del UCM95 al UCM98, aquellos más potentes, inhibiendo un 50 % la polimerización de BsFtsZ a una concentración de 25  $\mu$ M. Se determinó que el error estándar asociado a las medidas, tanto para FtsZ como para tubulina es de  $\pm 8\%$  y  $\pm 9\%$ , respectivamente.

La inhibición de la polimerización de BsFtsZ, en determinados casos, no se correlaciona con los resultados de afinidad de unión y de actividad antibacteriana obtenidos con los ligandos. De hecho, algunos de los compuestos considerados los más efectivos por su relación afinidad – actividad antibacteriana, como es el caso de UCM81 o UCM62 (de la serie anterior), no mostraron un efecto significativo en la inhibición de la polimerización de BsFtsZ. En cambio sí dieron resultados significativos, en este aspecto, otros compuestos que previamente no habían sido identificados como los más efectivos de la serie, como es el caso de UCM82, UCM97 o UCM98 (**Tabla 6**), posicionados en la parte izquierda inferior de la relación afinidad – actividad antibacteriana (**Figura 17**). Estos compuestos, a una concentración de 25 - 50  $\mu\text{M}$  inhiben la polimerización de FtsZ alrededor de un 70 % respecto al control positivo con GTP. No obstante, estos ligandos (a excepción de UCM97) a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  también inhiben la polimerización de tubulina, alrededor de un 60 % respecto al control positivo con GTP, por lo que su efecto en la inhibición de FtsZ no sería selectivo. En cambio, existen compuestos de la serie que no mostraron reactividad cruzada con tubulina como el compuesto UCM81, que a 100  $\mu\text{M}$  no afecta a la polimerización de tubulina pero sí inhibe, con un efecto más moderado (30 % a 25 y 50  $\mu\text{M}$ ), la formación de polímeros de FtsZ (**Tabla 6** y **Figura 18**).



**Figura 18.** Efecto en la polimerización de BsFtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) y de tubulina (8  $\mu\text{M}$ ) de los compuestos UCM62, UCM81, UCM82 y UCM95 a distintas concentraciones (5, 10, 20, y 50  $\mu\text{M}$  para BsFtsZ y 5, 25 50 y 100  $\mu\text{M}$  para tubulina). Estos experimentos se han llevado a cabo mediante la sedimentación de los polímeros en condiciones controladas de ensamblaje a un rango creciente de concentraciones de los ligandos seleccionados. Las muestras se han preparado en tampón Hepes (para BsFtsZ) y en GAB (para tubulina), con 6 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2% de DMSO, con un sistema de regeneración de nucleótido y 50  $\mu\text{M}$  de GTP. Para los controles se han preparado muestras con: 1mM de GTP (con SR) como control negativo de la inhibición de la polimerización y 1mM de GDP (sin SR) como control positivo de la inhibición de la polimerización. En tubulina también se ha añadido, como control positivo de la inhibición de microtúbulos, una muestra con podofilotoxina (PODO, 50  $\mu\text{M}$ ) (con SR).

Basándonos en la inhibición de la polimerización de FtsZ, los compuestos de esta serie se han clasificado en: inhibidores de FtsZ sin efecto cruzado con tubulina (o muy leve, menor del 5%), entre los cuales destacan UCM64, UCM78, UCM79, UCM81, UCM91, UCM92 y UCM97 (**Tabla 6**); inhibidores de FtsZ con un efecto cruzado débil ( $< 25\%$ ) entre los que están los compuestos UCM62, UCM93, UCM95 y UCM96; y aquellos compuestos que presentan reactividad cruzada entre las dos proteínas (UCM82, UCM83 y UCM98) (**Tabla 6, Figura 18**). Este efecto cruzado con tubulina, ya se vio con anterioridad con el compuesto parental UCM05, de la serie de derivados con el naftaleno como núcleo central.



**Figura 19. Micrografías electrónicas de los polímeros de BsFtsZ formados en presencia de los ligandos.** BsFtsZ (10  $\mu\text{M}$ ) en tampón Hepes, 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2% DMSO y 50  $\mu\text{M}$  de GTP en presencia de SR (15 mM acetil fosfato, 1 unid./mL acetato quinasa). **A.** En ausencia de compuesto. **B.** Con UCM81 a 50  $\mu\text{M}$ . **C.** Con UCM05 a 50  $\mu\text{M}$ . **D.** Con UCM64 a 50  $\mu\text{M}$ . Barras de magnificación, 100 nm.

Entre todos los compuestos, se escogió UCM81 para observar por microscopía electrónica el efecto que tiene en la polimerización de la proteína en condiciones similares al ensayo de sedimentación de los polímeros. También se comparó en este experimento el efecto de los compuestos parentales UCM05 y UCM64. Lo que se observó son distintos grados de inhibición en presencia de cada uno de los compuestos: con UCM81 y UCM64 se inhibe la formación de superestructuras de tipo toroide características en estas condiciones y, en general, se observa una reducción en la presencia de polímeros en la muestra. Con el compuesto UCM05 no se observó una reducción tan evidente de las superestructuras que se forman en el control con GTP en ausencia de compuesto (**Figura 19**).

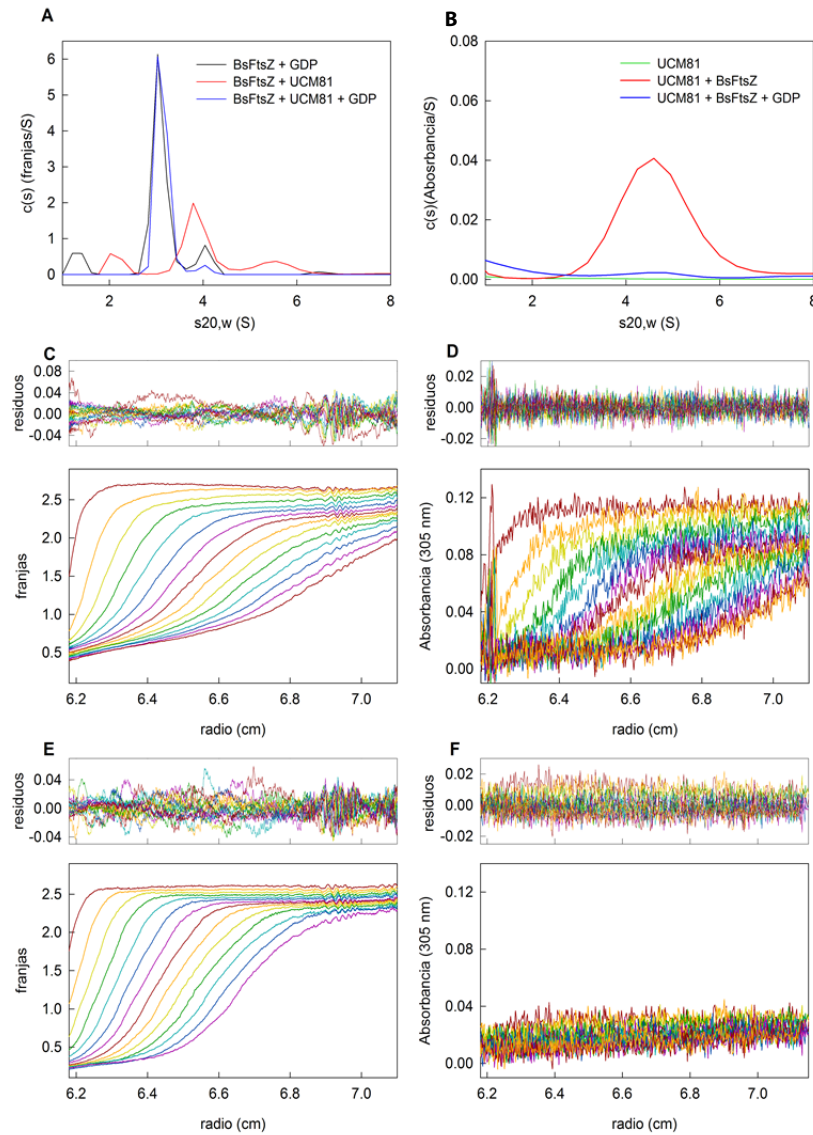
#### IV.1.5 Medida directa de la unión de UCM81 al sitio del GTP por ultracentrifugación analítica

Para confirmar la unión del ligando UCM81 al sitio del GTP en BsFtsZ se realizaron ensayos de velocidad de sedimentación en la ultracentrífuga analítica (AUC). Se seleccionó el *hit* UCM81 dada su alta afinidad por el sitio de GTP en BsFtsZ determinada mediante el desplazamiento de la sonda ( $K_d = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ), los buenos datos de MIC tanto en *B. subtilis* (MIC =  $5 \mu\text{M}$ ) como en *S. aureus* MRSA (MIC =  $7 \mu\text{M}$ ) y en el resto de bacterias patógenas probadas, y su efecto observado como inhibidor de la polimerización de BsFtsZ sin efecto cruzado de inhibición del ensamblaje de tubulina (**Figura 18 y 19**).

Mediante la monitorización de la velocidad de sedimentación de las muestras en la ultracentrífuga analítica es posible seguir la co-sedimentación del ligando con la proteína (**Figura 20**). El canal de absorbancia muestra la absorción del compuesto a 305 nm, longitud de onda a la que se da el máximo de absorción del ligando y a la que la proteína no absorbe, por lo que nos permite seguir únicamente la sedimentación del ligando. En el canal de interferencia se monitoriza la sedimentación de todas las partículas que desvían el haz de luz al atravesar la muestra, aunque en este caso sólo contribuye significativamente la proteína debido a su mayor tamaño. Si se comparan las velocidades de sedimentación en ambos canales para la muestra con proteína en presencia de UCM81, se puede ver que ambas moléculas interactúan, presentando el mismo coeficiente de sedimentación. Si no existiera interacción, el ligando no sedimentaría en estas condiciones. La distribución del

coeficiente de sedimentación del ligando, seguido por el canal de absorbancia a 305 nm (**Figura 20B**, línea roja),  $S_{20,w} = 4.6$  S, se puede ver que solapa con el pico de la distribución del coeficiente de sedimentación de la proteína en presencia del ligando,  $S_{20,w} = 3.8$  S y  $S_{20,w} = 5.4$  S (**Figura 20A**, canal de interferencia, línea roja). Esta distribución de coeficientes de sedimentación de la proteína pueden explicarse por una presencia de dímeros (3.8 S) y trímeros-tetrámeros (5.4 S) (**Figura 20A**), por lo que los resultados indican que la presencia del ligando UCM81 aumenta el grado de oligomerización de la proteína. Cuando a la muestra con FtsZ y UCM81 se le añade GDP, la unión del ligando a la proteína se revierte y en el canal de interferencia se puede ver cómo la proteína sedimenta igual que lo hace cuando no hay ligando en la muestra (**Figura 20A**, línea negra y azul), mientras que en el canal de absorción no se observa la sedimentación de UCM81 (**Figura 20B**, línea azul). Se ha calculado la relación de unión UCM81 – FtsZ en las condiciones del experimento, considerando el área de los picos de sedimentación de la muestra con ligando y proteína, y es de  $\sim 0.6$  moléculas de UCM81 por cada molécula de proteína.





**Figura 20. Cosedimentación de UCM81 y BsFtsZ analizada mediante velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica.** **A.** Distribución de los coeficientes de sedimentación  $c(s)$ , medidos con la óptica de interferencia, de 15  $\mu\text{M}$  BsFtsZ en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de GDP (línea negra,  $S_{20,w} = 3.0$  S, correspondiente a monómeros), en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de UCM81 (línea roja, 3.8 y 5.4 S correspondientes a dímeros, trímeros-tetrámeros), y en presencia de GDP y UCM81 a 200  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ , respectivamente, (línea azul,  $S_{20,w} = 3.0$  S). **B.** Distribución de los coeficientes de sedimentación del ligando medidas por absorbancia radial a 305 nm, para las muestras: con el compuesto sin proteína (línea verde), con proteína y UCM81 (línea roja) y con proteína, ligando y GDP (línea azul). **C.** Barridos sucesivos de interferencia radial de la distribución de BsFtsZ en presencia del ligando UCM81 durante el experimento. **D.** Barridos de la absorbancia radial a 305 nm que permiten seguir la co-sedimentación del ligando en el mismo experimento que en C. **E y F.** son las mismas medidas que C y D (respectivamente) pero en este caso con las muestras en presencia de GDP. En F se observa que el ligando no co-sedimenta con FtsZ por acción del GDP. Se muestra un barrido de cada dos realizados y los residuos del ajuste. Todos los ensayos se han llevado a cabo en tampón Hepes (pH 6.8) con 10 mM de  $\text{MgCl}_2$  y 2% de DMSO a 25 °C.

#### IV.1.6 Efecto de los inhibidores en células de *B. subtilis* y en células humanas

Los efectos de los antibióticos en las células bacterianas, cuyo análisis engloba la morfología celular, el efecto en la permeabilidad de la membrana, la disposición del nucleoide, o la deslocalización de la maquinaria de división celular, entre otros, ha sido descrito como un método útil para clasificar a los antibióticos según su mecanismo de acción (Nonejuie *et al.*, 2013; Nonejuie *et al.*, 2016; Araújo-Bazán *et al.*, 2016). Se ha descrito que la inhibición específica de FtsZ bloquea la división celular e induce la formación de células elongadas. Además, estudios previos, como por ejemplo con el compuesto 8J, han mostrado que si en células de *B. subtilis* y *E. coli* que expresan FtsZ unida a una proteína fluorescente se inhibe la función de FtsZ, se observan anillos deslocalizados, anillos dobles, anillos aberrantes y/o acúmulos de FtsZ a lo largo de toda la célula, denominados también como *foci* (Adams *et al.*, 2011).

Para estudiar el fenotipo que causan los compuestos, se analizó el efecto de los ligandos en la morfología de las células en la cepa silvestre de *B. subtilis* 168 (por microscopía de contraste de fases), y en la localización del anillo Z (mediante microscopía de fluorescencia) en la cepa de *B. subtilis* SU570, que contiene FtsZ fusionada a GFP como única FtsZ. Para saber si la membrana celular sufre daños por la acción de los compuestos, se añadió yoduro de propidio (tiñe la célula cuando la integridad de la membrana está comprometida) al cultivo de *B. subtilis* 168, 10 minutos antes de visualizar las muestras al microscopio (ver apartado **Materiales y métodos**). Puesto que se ha visto que la disposición de los OH en el anillo influye poco en la afinidad por el sitio de GTP en BsFtsZ y la actividad antibacteriana, se decidió no incluir en este estudio los compuestos UCM80 y UCM94, que igual que los fragmentos UCM82 y UCM91 tienen un solo anillo de galato con uno y dos OH, respectivamente, asumiendo que los resultados serían muy similares. Se analizaron los compuestos UCM83, UCM91, UCM97 y UCM98, pero no se muestran los resultados porque no se observó un efecto significativo de elongación de las células y como consecuencia no se caracterizó su efecto en la cepa *B. subtilis* SU570. El compuesto UCM96, en cambio, sí presentó efecto en la filamentación de las células, pero dado que no mostró efecto en la deslocalización del anillo Z, tampoco se prosiguió con una caracterización más detallada de este ligando (ninguno de ellos se ha incluido en la **Tabla 7**). En la mayoría de los casos, los compuestos se probaron a concentraciones por debajo de las que se observó efecto antibacteriano, ya que a concentraciones iguales a las MIC

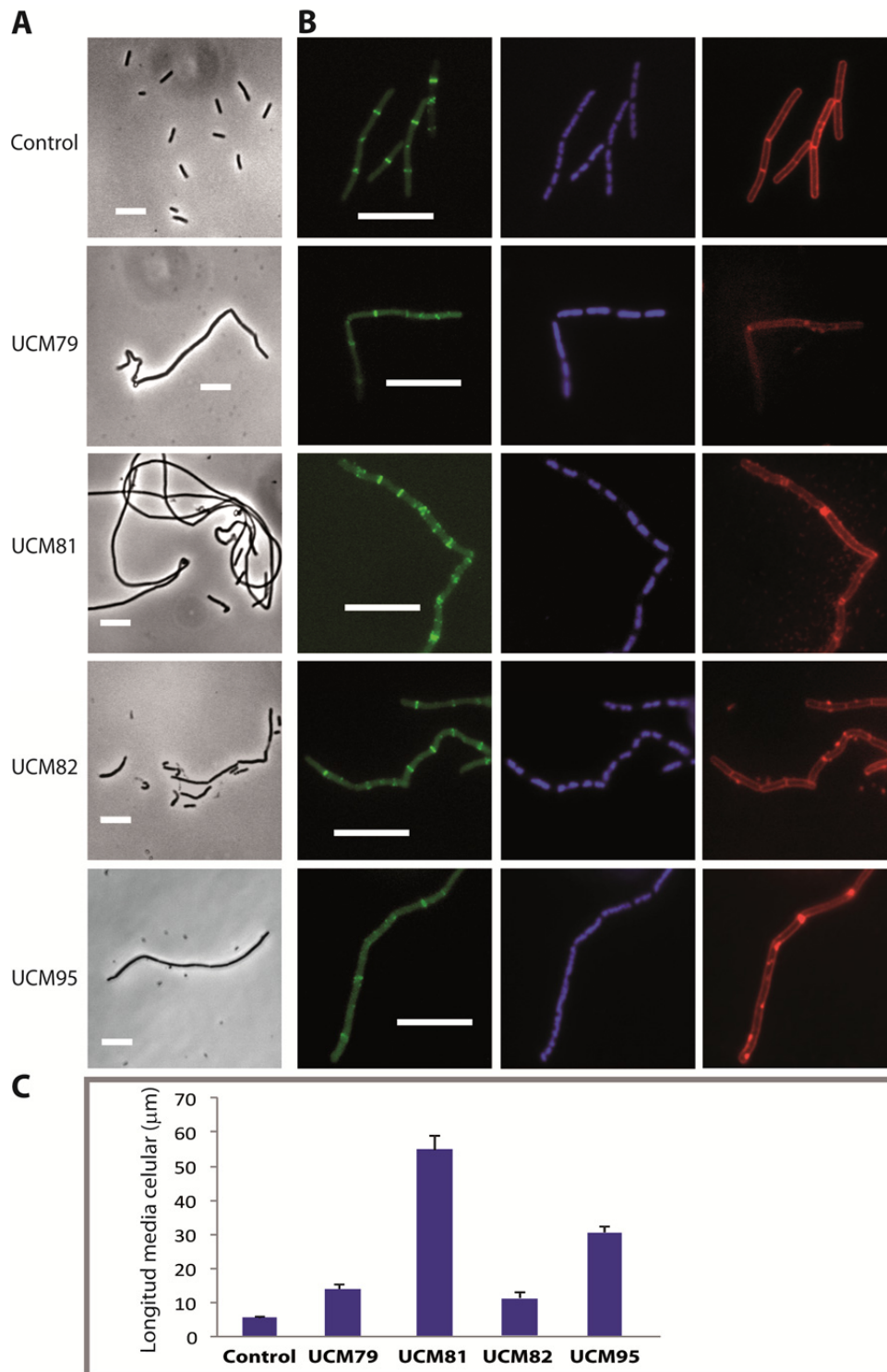
tienen un efecto bactericida a las pocas horas de incubación. Los resultados indican que estos compuestos afectan a la división celular y a la deslocalización del anillo Z, siendo los compuestos UCM79, UCM81, UCM82 y UCM95, los que mostraron el mayor efecto de toda esta serie de inhibidores en células de *B. subtilis*.

Para cuantificar el efecto de los compuestos en la elongación celular, se midió la longitud de las células tras la incubación con los compuestos y se compararon las medidas con el control. Con el compuesto UCM79 se observó un efecto leve en la filamentación de las células. En presencia del ligando UCM81 las células alcanzan un tamaño hasta 9 veces mayor que en ausencia de compuesto (**Figura 21C**). Con UCM81, además, la membrana celular se mantiene intacta, pues se vio que el yoduro de propidio no tiñe el interior celular. UCM95 y UCM82 también inducen claramente la filamentación de las células, aunque en el caso de UCM82 la longitud celular observada es menor. Al analizar el efecto de estos compuestos en el anillo Z se observó que UCM79, UCM81, UCM82 y UCM95 producen la deslocalización de anillos Z y la formación de anillos aberrantes en la cepa *B. subtilis* SU570 (**Figura 21B**). Este efecto fue más evidente con los compuestos UCM81, UCM82 y UCM95. Cabe destacar que con UCM82 se observó un menor número de anillos en la célula, al contrario de lo que ocurre con los compuestos UCM79, UCM81 y UCM95, que incrementan la presencia de anillos Z más próximos entre sí, siendo UCM81 el compuesto con el efecto más significativo. Otra característica observada con estos ligandos es la aparición de *foci* en las células afectadas (**Figura 21** y **Tabla 7**). Se analizó también su efecto en el nucleóide (teñido con DAPI) y en la membrana celular (teñida con el colorante FM4-64) en la cepa SU570. La deslocalización del anillo Z suele correlacionarse con una morfología anormal del nucleóide (**canal DAPI, Figura 21B**), que aparece fragmentado. En muchos casos esta fragmentación del nucleóide co-localiza con la aparición de anillos aberrantes o *foci* de FtsZ a lo largo de la célula (**canal GFP y DAPI, Figura 21B**). En presencia del compuesto UCM95 la reducción en el tamaño del nucleóide resultó ser muy evidente, mientras que en presencia del resto de compuestos este efecto no fue tan claro. En cuanto a la membrana celular (**canal FM4-64, Figura 21B**) se vio que después del tratamiento con algunos de los compuestos probados (UCM82 y UCM95) aparecen discontinuidades en la membrana que indican regiones dañadas (**canal GFP y FM4-64, Figura 21B**).

**Tabla 7. Efecto en células de los compuestos con las modificaciones químicas más representativas.** Se muestra el efecto en *B. subtilis* 168, *B. subtilis* SU570, y en dos líneas celulares humanas: IMRO90 y A549.

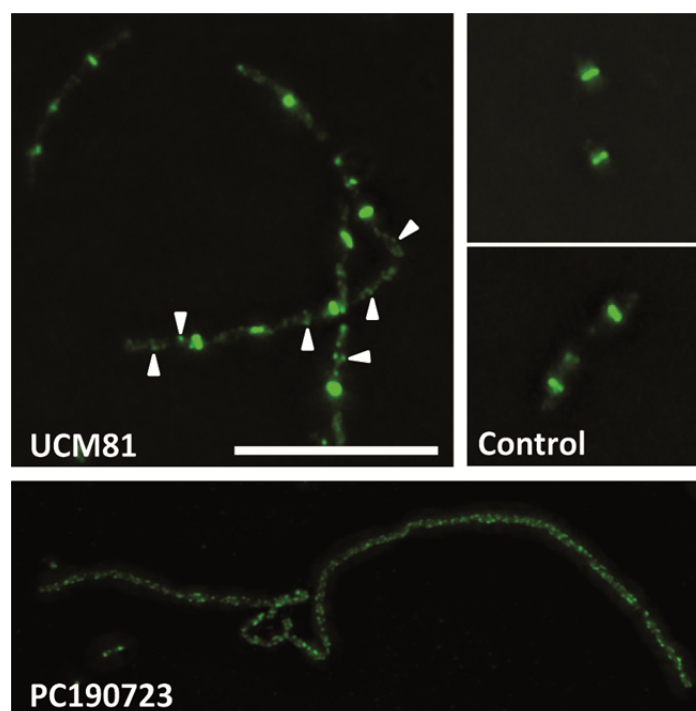
Compuesto	Efecto en <i>B. subtilis</i> 168 (μM comp.)	Efecto en <i>B. subtilis</i> SU570 (μM comp.)	GI50 IMRO90 (μM comp.) <sup>C</sup>	GI50 A549 (μM comp.) <sup>D</sup>
UCM05	Filamenta <sup>A</sup> (50)	<i>foci</i> <sup>B</sup> (40)	50 ± 10	13 ± 3
UCM62	Filamenta <sup>A</sup> (5)	<i>foci</i> <sup>B</sup> , anillos aberrantes (5)	34 ± 6	29 ± 5
UCM64	Filamenta <sup>A</sup> (20)	<i>foci</i> (20)	60 ± 6	18 ± 3
UCM78	Filamenta <sup>A</sup> (3). Lisis de la membrana celular	Pocos <i>foci</i> <sup>B</sup> , anillos aberrantes (2)	50 ± 1	23 ± 1
UCM79	Filamenta <sup>A</sup> (5). Lisis de la membrana celular	Pocos <i>foci</i> <sup>B</sup> , anillos aberrantes (2)	44 ± 6	30 ± 1
UCM81	Filamenta <sup>A</sup> (4)	Pocos <i>foci</i> <sup>B</sup> , anillos aberrantes (3)	11 ± 1	13 ± 2
UCM82	Filamentos cortos <sup>A</sup> (25)	Pocos <i>foci</i> <sup>B</sup> , pocos anillos (25)	66 ± 3	53 ± 7
UCM92	Filamenta <sup>A</sup> (8)	<i>foci</i> <sup>B</sup> (8)	60 ± 4	47 ± 1
UCM93	Filamenta <sup>A</sup> (8)	<i>foci</i> <sup>B</sup> (8)	14 ± 3	15 ± 2
UCM95	Filamenta <sup>A</sup> (12)	Pocos <i>foci</i> <sup>B</sup> , anillos aberrantes (12)	50 ± 2	36 ± 1

<sup>A</sup> Formación de células alargadas incapaces de dividirse con la membrana celular intacta, excluyendo el yoduro de propidio. Las concentraciones de cada compuesto, indicadas entre paréntesis, inhiben la división celular. <sup>B</sup> Formación de *foci* a lo largo de la célula, con algunos anillos restantes. En algunos casos, formación de anillos aberrantes a lo largo de la célula (espaciado inadecuado, como la formación de anillos dobles, o bien deslocalización de anillos) Entre paréntesis se muestra la concentración efectiva de cada compuesto. <sup>C</sup> IMRO90: células de fibroblasto de pulmón. <sup>D</sup> A549: células de carcinoma humano de pulmón.



**Figura 21.** Efecto de los inhibidores en la morfología de *B. subtilis* 168 y en la localización del anillo **Z** en *B. subtilis* SU570. **A.** Imágenes de células de *B. subtilis* 168 incubadas durante 3 horas en presencia de UCM79 (5  $\mu\text{M}$ ), UCM81 (4  $\mu\text{M}$ ), UCM82 (25  $\mu\text{M}$ ), UCM95 (12  $\mu\text{M}$ ) y un control con 2 % de DMSO, observadas por microscopía de contraste de fases. **B.** Imágenes de células de *B. subtilis* SU570 en presencia de UCM79 (2  $\mu\text{M}$ ), UCM81 (3  $\mu\text{M}$ ), UCM82 (25  $\mu\text{M}$ ), UCM95 (6.25  $\mu\text{M}$ ) y un control con 2 % de DMSO, observadas por microscopía de fluorescencia. Las imágenes, de izquierda a derecha, muestran los marcajes para GFP-FtsZ (canal verde), DAPI (canal azul), FM4-64 (canal rojo). Las barras de escala corresponden a 10  $\mu\text{m}$ . **C.** Medidas de la longitud media celular en células de *B. subtilis* 168 tras su incubación durante 3h con los compuestos a la misma concentración que en **A**.

Los compuestos UCM78 y UCM79, que con FM4-64 mostraron células de *B. subtilis* SU570 con discontinuidades en la membrana, también dieron un mayor número de células de *B. subtilis* 168 teñidas con yoduro de propido (imágenes no mostradas). Aunque en este trabajo no se llegó a cuantificar el efecto de los ligandos en el nucleóide ni en la membrana celular, trabajos posteriores realizados en el laboratorio, caracterizaron en detalle su perfil citológico (Araújo-Bazán *et al.*, 2016). El efecto en la deslocalización del anillo Z y formación de *foci* observado en presencia de UCM81 en la cepa SU570, se confirmó mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales anti-FtsZ en *B. subtilis* 168. Estos anticuerpos se generaron frente al péptido sintético SVPKREPKREEPQQ, correspondiente a la secuencia comprendida entre los residuos 340–353 de FtsZ de *B. subtilis* (**Figura 22**). En este ensayo se incluyó un control sin compuesto y otro con el compuesto PC190723, como control positivo.



**Figura 22. Efecto de UCM81 en la localización del anillo Z detectado por Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales anti-FtsZ en *B. subtilis* 168.** Las células de *B. subtilis* 168 se incubaron durante 3h con UCM81 (3  $\mu$ M) y PC190723 (22  $\mu$ M), se fijaron con metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 h, y se han permeabilizaron con lisozima. Las células se incubaron con los anticuerpos anti-FtsZ (dilución 1:500) durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . El anticuerpo secundario empleado (anti-IgG de conejo producido en cabra conjugado con Alexa488), se añadió a una dilución 1:10000, durante 1 hora a  $25^{\circ}\text{C}$ . El montaje de las muestras se realizó con 50% de glicerol en tampón PBS. Barra de escala: 200nm

Para descartar cualquier efecto de reactividad cruzada en células eucariotas, estos compuestos se probaron en fibroblastos de pulmón humanos (Artola *et al.*, 2015). Para ello, se determinaron los valores de GI50 (concentración de compuesto necesaria para detectar un 50 % de inhibición en la proliferación celular) en estas líneas celulares. Los resultados indican que las concentraciones de compuesto requeridas para afectar a estas células son mayores que las que hacen falta para que se produzca inhibición del crecimiento bacteriano (**Tabla 7**), por lo que se puede considerar que estos ligandos tienen un efecto selectivo en bacterias. Adicionalmente, se observó que estos compuestos no son inhibidores mitóticos, y sus valores de GI50 en células humanas no se correlacionan con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición *in vitro* del ensamblaje de tubulina (**Tabla 7**).

En resumen, en este trabajo se han identificado pequeñas moléculas capaces de inhibir FtsZ con una afinidad alta por el sitio de unión de GTP. Estos compuestos inhiben de forma efectiva el ensamblaje de la proteína sin afectar significativamente la polimerización de tubulina. Además, han mostrado una elevada actividad antibacteriana frente a cepas patógenas Gram-positivas multiresistentes. De entre todos los compuestos de esta nueva serie con un núcleo de bifenilo, el compuesto UCM81 es el ligando más prometedor, con una buena afinidad ( $K_d = 0.5 \mu\text{M}$ ) y actividad antibacteriana [MIC (MRSA)=  $7 \mu\text{M}$ ]. UCM81, junto a UCM79, UCM82 y UCM95, actúa como un modulador efectivo del ensamblaje de FtsZ y produce células incapaces de dividirse que acaban muriendo.

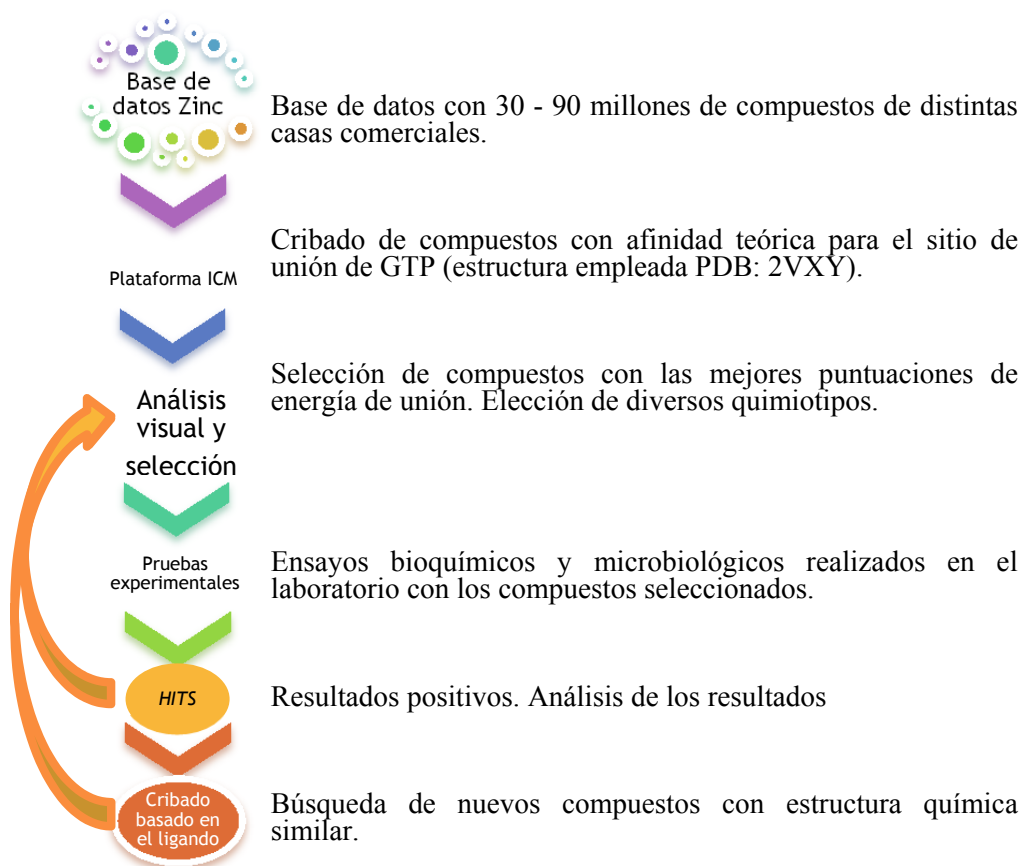
#### IV.2 Compuestos con afinidad por el sitio de unión del GTP en FtsZ obtenidos a partir de cribado virtual

Con el objetivo de buscar ligandos con una mayor diversidad química, se llevó a cabo un segundo proyecto basado en cribado virtual, en colaboración con el grupo del Dr. Pablo Chacón del Instituto de Química Física Rocasolano (IQFR, CSIC) (**Figura 23**). Previamente en el laboratorio, ya se habían probado compuestos provenientes de un cribado virtual con la plataforma VSDMIP (Gil-Redondo *et al.*, 2009, siguiendo el protocolo descrito en Ruiz *et al.*, 2008; Borroto *et al.*, 2016), pero desafortunadamente ninguno de los compuestos seleccionados dio resultados positivos en las pruebas realizadas en el laboratorio. Para este primer cribado (*Virtual Screening 1*) se empleó la estructura cristalográfica de FtsZ de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB: 1OFU) (Schaffner-Barbero *et al.*, 2010) y se probaron 20 candidatos seleccionados a partir de las 100 moléculas propuestas con las mejores puntuaciones de unión al sitio del GTP en la proteína. Para el segundo cribado (*Virtual Screening 2*), se empleó la plataforma ICM (Totrov y Abagyan, 1997), con la estructura cristalográfica de FtsZ de *B. subtilis* (PDB: 2VXY), que es la forma apo de la misma proteína con la que se realizaron *a posteriori* las pruebas de unión *in vitro*. En este caso, se enfrentaron más de 4 millones de compuestos no redundantes de la base de datos ZINC, de los que se seleccionaron y compraron 41 con las mejores puntuaciones de energía de unión, solubilidad teórica y variabilidad química entre sí para explorar distintas posibilidades. De estos 41 compuestos, 26 fueron probados sin éxito por Laura Ruíz-Ávila. En esta Tesis doctoral se probaron los 15 restantes en un ensayo de competición por el sitio de unión del GTP en BsFtsZ. A continuación (**Tabla 8**) se muestran los compuestos probados, con la estructura de cada uno, su código SMILES, y los valores de teóricos de unión al sitio obtenidos para cada uno de ellos.

De los 15 compuestos seleccionados se pudieron estudiar 14 en el ensayo de desplazamiento de la sonda *mant*-GTP del sitio de unión en BsFtsZ, puesto que uno de ellos (VS2.1) era insoluble en nuestro tampón experimental (Hepes). El resto mostraron unos valores de solubilidad en tampón Hepes por encima de 200  $\mu\text{M}$  (incluso por encima de 600  $\mu\text{M}$ , en algunos casos). De todos ellos, el compuesto VS2.18 es el único que desplaza al *mant*-GTP del sitio de unión de nucleótido en BsFtsZ. Mediante el ajuste de la curva de desplazamiento con concentraciones crecientes del compuesto, se determinó que la afinidad de VS2.18 por el sitio de unión de GTP es de  $K_d = 104 \pm 38 \mu\text{M}$  (**Figura 24**),

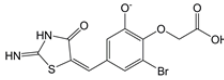
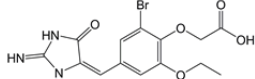
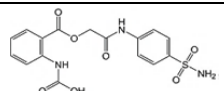
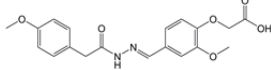
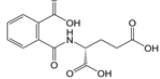
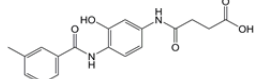
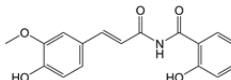
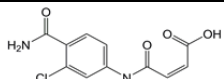
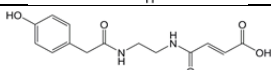
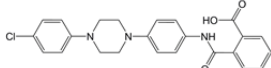
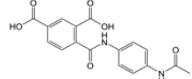
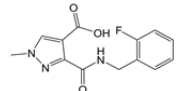
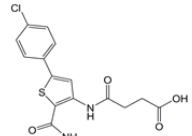
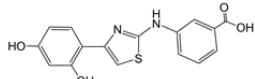
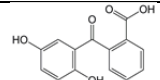
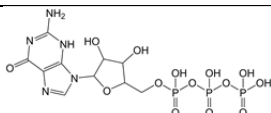


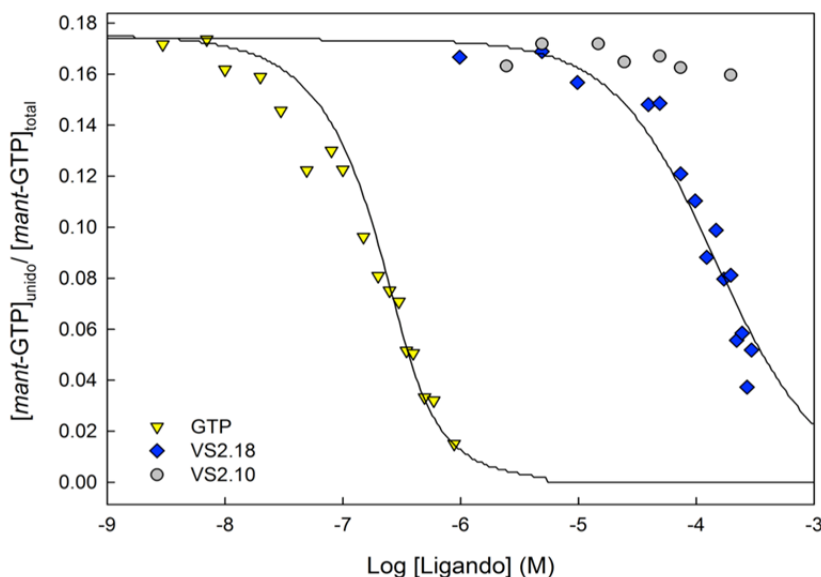
aunque dicho compuesto no presenta actividad antibacteriana en células de *B. subtilis* 168 (MIC > 600  $\mu$ M). El compuesto VS2.11 mostró un leve efecto en la inhibición del crecimiento de *B. subtilis* (MIC = 200  $\mu$ M) pero, debido a que esta actividad no se podía correlacionar con la unión a nuestra proteína de interés, este compuesto no se tuvo en consideración para continuar con su estudio.



**Figura 23. Esquema de los métodos empleados para la obtención de los inhibidores de este proyecto.** Se han llevado a cabo dos cribados virtuales, uno basado en la estructura del sitio de unión a la proteína, al que se enfrentó una quimioteca de más de 4 millones de compuestos, y otro cribado basado en la estructura del ligando que dio resultados positivos de unión a FtsZ en las pruebas bioquímicas realizadas en el laboratorio.

**Tabla 8. Estructura química de los compuestos provenientes del cribado virtual.** Se indica el código SMILES, características de fármaco y puntuaciones de las energías teóricas de unión para el sitio de nucleótido (cálculo de ICM Platform) en BsFtsZ (2VXY) obtenidas en el cribado virtual para cada uno de ellos. Se muestra también el GTP y su energía de unión calculada por el programa, frente a la estructura 2VXY.

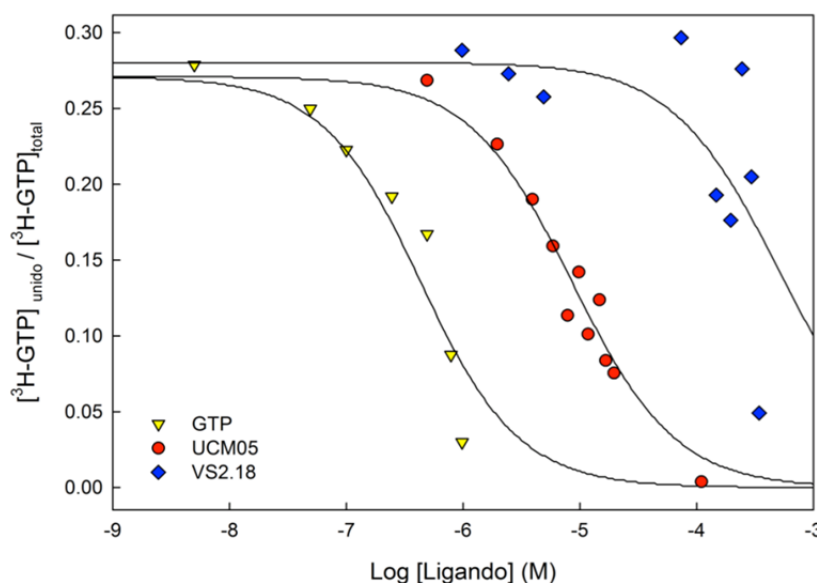
Nombre	Estructura	Código SMILES	Características de fármaco	Energía de unión (Kcal/mol)
VS2.1		<chem>[O-]C1=C(OCC(O)=O)C(Br)=CC(/C=C2C(NC(S\2)=N)=O)=C1</chem>	0.01253	-47.1
VS2.2		<chem>O=C(O)COC1=C(OCC)C=C(/C=C2C(NC(N\2)=N)=O)C=C1Br</chem>	0.2401	-41.71
VS2.4		<chem>O=C(O)NC1=C(C(OCC(NC2=CC=C(S(N)(=O)=O)C2)=O)=O)C=CC=C1</chem>	0.6764	-37.2
VS2.5		<chem>O=C(COC1=C(C=C(C=C1)/C=N/NC(CC2=CC=C(C=C2)OC)=O)OC)O</chem>	0.1339	-36.22
VS2.9		<chem>O=C(O)CC[C@@H](NC(C1=C(C(O)=O)C=CC=C1)=O)C(O)=O</chem>	0.4485	-41.97
VS2.10		<chem>O=C(O)CCC(NC1=CC(O)=C(NC(C2=CC=CC(C)=C2)=O)C=C1)=O</chem>	0.3064	-39.47
VS2.11		<chem>OC1=CC=C(/C=C/C(C(NC2=C(O)C=CC=C2)=O)C=C1OC</chem>	0.7074	-42.19
VS2.12		<chem>O=C(/C=C/C(O)=O)NC1=CC=C(C(N)=O)C(Cl)=C1</chem>	0.5608	-37.28
VS2.13		<chem>O=C(/C=C/C(NCCNC(C1=CC=C(O)C=C1)=O)O</chem>	0.03366	-37.04
VS2.14		<chem>ClC1=CC=C(N2CCN(C3=CC=C(NC(C4=CC=CC=C4C(O)=O)=O)C=C3)CC2)C=C1</chem>	0.8393	-37.78
VS2.15		<chem>O=C(O)C1=CC(C(O)=O)=C(C(NC2=CC=C(NC(C=O)C=C2)=O)C=C1</chem>	0.386	-36.81
VS2.16		<chem>FC1=C(C=CC=C1)CNC(C2=NN(C=C2C(O)=O)C=O</chem>	0.522	-37.02
VS2.17		<chem>ClC1=CC=C(C2=CC(NC(CCC(O)=O)=O)=O)C(C(N)=O)S2)C=C1</chem>	1.413	-41.37
VS2.18		<chem>OC1=CC(O)=C(C2=CSC(NC3=CC=CC(C(O)=O)=O)C=C3)C=C1</chem>	0.7389	-37.52
VS2.19		<chem>O=C(O)C1=C(C(C2=C(O)C=CC(O)=C2)=O)C=CC=C1</chem>	1.341	-38.71
GTP		<chem>C1=NC2=C(N1C3C(C(C(O3)COP(=O)(O)OP(=O)(O)OP(=O)(O)O)O)NC(=NC2=O)N</chem>	-	-43.35



**Figura 24. Curvas de desplazamiento de *mant*-GTP de su sitio de unión en BsFtsZ.**

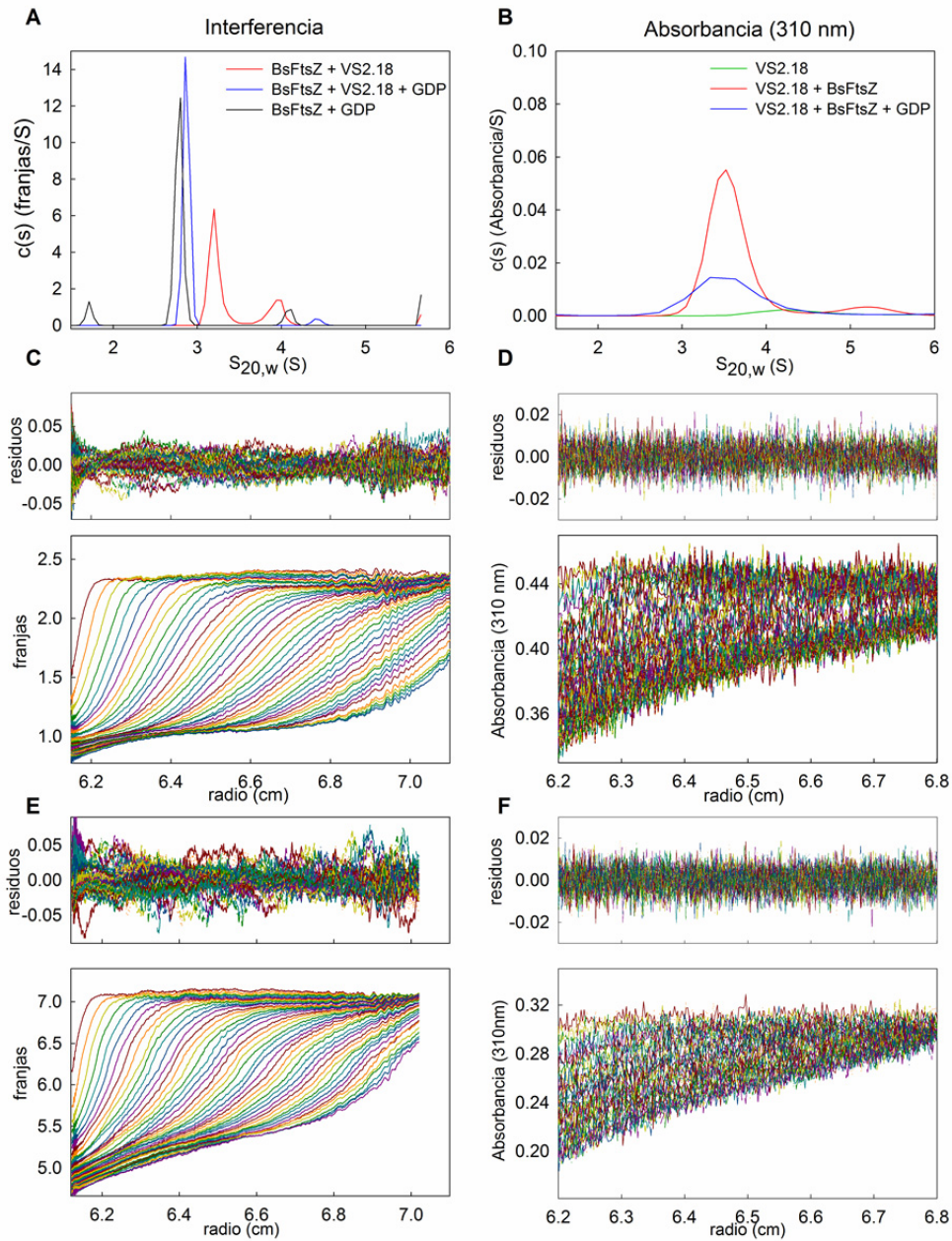
Los ensayos se han realizado con 750 nM de BsFtsZ en tampón Hepes, con 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2% de DMSO, 500 nM de *mant*-GTP y concentraciones crecientes del compuesto VS2.18, ( $K_d = 104 \pm 38 \mu\text{M}$ ) (rombos azules). A modo de comparación se muestra el desplazamiento del ligando natural, GTP ( $K_d = 0.03 \pm 0.01 \mu\text{M}$ ) (triángulos amarillos), y el compuesto VS2.10 que no es capaz de desplazar la sonda (círculos grises). Las líneas se corresponden con el mejor ajuste a los datos con un método de competición de los ligandos por el sitio de unión.

Para confirmar la unión de VS2.18 en el sitio del GTP en BsFtsZ, se llevó a cabo un ensayo de desplazamiento del nucleótido tritiado ( $^3\text{H}$ -GTP). Con este ensayo se obtuvo una constante de desplazamiento  $K_d \sim 29 \mu\text{M}$  (**Figura 25**). Esta constante difiere de la constante de disociación obtenida con este ligando en el ensayo de desplazamiento del *mant*-GTP ( $K_d = 104 \pm 38 \mu\text{M}$ ). A pesar de poder ajustar los datos en la medida de desplazamiento de  $^3\text{H}$ -GTP, la reproducibilidad del ensayo es significativamente más baja debido al error instrumental del contador de centelleo disponible. Esto afecta también al ajuste y a la obtención de la constante de unión. No obstante este resultado nos permite apoyar que el compuesto es capaz de desplazar al nucleótido del sitio de unión en BsFtsZ. Como controles positivos de este ensayo se emplearon tanto el GTP, como el compuesto UCM05, cuyo desplazamiento de  $^3\text{H}$ -GTP del sitio de unión en BsFtsZ ya había sido determinado en ensayos anteriores (Ruiz-Avila *et al.*, 2013) (GTP:  $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ , UCM05:  $K_d = 4.3 \mu\text{M}$ ).



**Figura 25. Desplazamiento de  $^3\text{H}$ -GTP de su sitio de unión en BsFtsZ por los ligandos.** Las muestras se han preparado con 750 nM de BsFtsZ en tampón Hepes con 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 2% de DMSO, 100 nM de  $^3\text{H}$ -GTP, y concentraciones crecientes de: VS2.18 (rombos azules), UCM05 (círculos rojos), y GTP (triángulos amarillos). Las constantes de afinidad, expresadas en  $K_d$ , calculadas son: GTP:  $K_d = 0.2 \mu\text{M}$ , UCM05:  $K_d = 4.3 \mu\text{M}$ ; y VS2.18:  $K_d \sim 29 \mu\text{M}$ . Las curvas muestran el mejor ajuste de los datos experimentales a un modelo de competición.

También mediante un ensayo de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica, analizando directamente la unión de VS2.18 a BsFtsZ y en competición con GDP (**Figura 26**). El resultado indica la unión de VS2.18 a FtsZ puesto que proteína y ligando co-sedimentan presentando un coeficiente de sedimentación:  $s_{20,w} = 3.5 \text{ S}$ , compatible con un dímero de FtsZ, y esta unión se revierte en presencia de GDP, donde se observa un pico  $s_{20,w} = 2.7 \text{ S}$ , compatible con un monómero de la proteína (**Figura 26A**). En ausencia de proteína (**Figura 26B**, línea verde), no se detecta sedimentación de VS2.18, lo que también nos indica que no hay agregación del ligando. Con los resultados obtenidos (área de los picos del ligando y de la proteína) se ha calculado, teniendo en cuenta la concentración inicial de proteína en el experimento, que alrededor de 0.3 moléculas de ligando co-sedimentan por cada molécula de proteína.



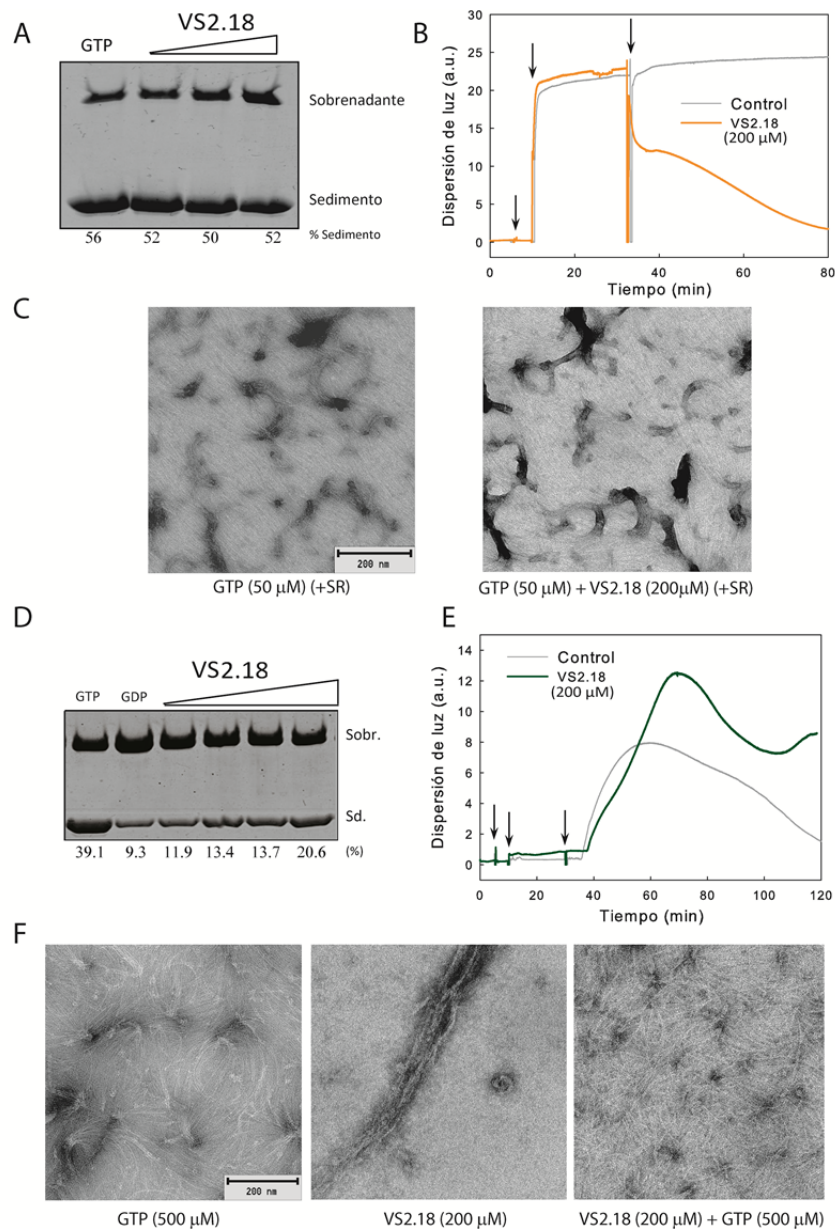
**Figura 26. Unión de VS2.18 a BsFtsZ determinado mediante un ensayo de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica.** **A.** Distribución de los coeficientes de sedimentación de la proteína  $c(s)$  medido con la óptica de interferencia de  $15 \mu\text{M}$  de BsFtsZ en presencia de  $100 \mu\text{M}$  de GDP (línea negra), en presencia de  $30 \mu\text{M}$  de VS2.18 (línea roja), y en presencia de ambos, GDP y VS2.18,  $100 \mu\text{M}$  y  $30 \mu\text{M}$ , respectivamente, (línea azul). **B.** Distribución de los coeficientes de sedimentación del ligando medidos por absorbancia radial a  $310 \text{ nm}$  del compuesto solo (línea verde), en presencia de BsFtsZ (línea roja) y con BsFtsZ y GDP (línea azul). **C.** Barridos radiales sucesivos de interferencia de la distribución de BsFtsZ durante el experimento en presencia del ligando VS2.18. **D.** Barridos de la absorbancia radial a  $310 \text{ nm}$  que permiten seguir la co-sedimentación del ligando en el mismo experimento que en **C**. **E** y **F.** son las mismas medidas que **C** y **D** (respectivamente) pero en este caso con las muestras que además llevan GDP. En **F** se observa que el ligando no sedimenta con la proteína por acción del GDP. Todos los ensayos han sido realizados en tampón Hepes (pH 6.8),  $10 \text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$  y  $2 \%$  de DMSO, a  $25^\circ\text{C}$ .

#### IV.2.1 Efecto de VS2.18 en la polimerización de BsFtsZ

Se estudió el efecto del compuesto VS2.18 en el ensamblaje de BsFtsZ, mediante un ensayo de sedimentación de polímeros. Las muestras con proteína (10  $\mu\text{M}$ ) y varias concentraciones del compuesto (50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ ) se incubaron en presencia de GTP (50  $\mu\text{M}$ ) y un sistema de regeneración de nucleótido (SR), con 10 mM de  $\text{MgCl}_2$ , en tampón Hepes (pH 6.8). A continuación se centrifugaron y se cargaron en un gel SDS-PAGE, después de separar el sobrenadante y el sedimento. El compuesto VS2.18 no inhibe significativamente la polimerización de BsFtsZ en presencia de GTP y SR (**Figura 27A**), ya que a todas las concentraciones de compuesto probadas, el porcentaje de polímeros en el sedimento no difiere significativamente del observado en presencia de GTP y sin compuesto.

Este ensayo se complementó con otro en el que se monitoriza indirectamente la polimerización de la proteína mediante dispersión de luz a ángulo recto. Para realizar este experimento, se incubó la muestra de BsFtsZ,  $\text{MgCl}_2$ , y SR, con GTP, y seguidamente se añadió el ligando a una concentración de 200  $\mu\text{M}$ . Se observó una disminución progresiva de la luz dispersada por la muestra a medida que transcurre el tiempo de incubación con el compuesto, lo que significa que está induciendo la despolimerización de la proteína (**Figura 27B**). Para analizar más en detalle este resultado, durante este experimento se tomaron muestras para observar los polímeros por microscopía electrónica. Las imágenes de microscopía no mostraron diferencias significativas entre las muestras sin y con VS2.18, pues en ambos casos se observaron manojos de filamentos (**Figura 27C**). Aunque con los resultados de la cinética de ensamblaje uno esperaría una disminución en la cantidad y el tipo de filamentos observados por microscopía electrónica en presencia de VS2.18, sí es cierto que la adsorción de la muestra en una superficie puede favorecer el contacto entre polímeros, lo que explicaría que no se observen diferencias entre las muestras con y sin compuesto por microscopía electrónica.





**Figura 27. Efecto de VS2.18 en la polimerización de BsFtsZ.** **A.** Gel SDS-PAGE con el sobrenadante y el sedimento de cada una de las muestras del ensayo de sedimentación de polímeros, correspondientes a la incubación de BsFtsZ (10 μM) en tampón Hepes con 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2% de DMSO, SR, GTP (50 μM) con VS2.18 (50, 100 y 200 μM). Las muestras se centrifugaron durante 20 minutos a 100.000 rpm a 25 °C. **B.** Cinética del ensamblaje de BsFtsZ en las mismas condiciones que en *A*, seguida mediante dispersión de luz; las flechas negras indican (en este orden) la adición de: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, GTP (50 μM), y VS2.18 (200 μM) (línea amarilla) o bien DMSO (línea gris). **C.** Micrografías electrónicas de las muestras tomadas en el minuto 70 de las cinéticas representadas en *B*. **D.** Gel SDS-PAGE con el sobrenadante y el sedimento de cada una de las muestras del ensayo de sedimentación de polímeros de BsFtsZ (10 μM) en ausencia de GTP y en presencia de VS2.18 (50, 100, 150 y 200 μM), más los controles con GTP (1mM) y GDP (1mM). **E.** Ensamblaje de BsFtsZ (10 μM), seguido por dispersión de luz, en presencia de VS2.18 (200 μM) y GTP (500 μM). Las flechas negras indican (en este orden) la adición de: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, VS2.18 (200 μM) (línea verde) o bien DMSO (línea gris), y GTP (500 μM). **F.** Micrografías electrónicas de las muestras tomadas en la cinética representada en *E*. Las imágenes muestran un control con GTP (500 μM), una muestra sin nucleótido con VS2.18 a 200 μM, y una muestra con el ligando VS2.18 (200 μM) y GTP (500 μM). Barra de escala: 200 nm.

Para estudiar el efecto de VS2.18 sobre BsFtsZ en ausencia de nucleótido, se realizó un ensayo de sedimentación de la proteína a 10  $\mu\text{M}$  en presencia de distintas concentraciones de compuesto (50, 100, 150 y 200  $\mu\text{M}$ ). En estas condiciones, se ha observado que, a medida que aumenta la concentración de compuesto, también lo hace la cantidad de proteína que aparece en el sedimento después de centrifugar (**Figura 27D**). A una concentración de VS2.18 de 200  $\mu\text{M}$ , la proteína sedimenta casi un 21 % respecto al total. Este porcentaje es casi la mitad del porcentaje que se ha obtenido con el control positivo con GTP, que es del 39 %, y el doble respecto al control negativo con GDP (9 %).

Se realizaron cinéticas de ensamblaje con BsFtsZ seguidas mediante dispersión de luz y se observó un aumento de la luz dispersada al añadir VS2.18. En base a lo observado, parece que la unión del ligando no impide el ensamblaje de la proteína si, a continuación, se añade GTP, aunque en este caso, la presencia de VS2.18 sí altera la despolimerización de la proteína, tal y como se observa a tiempos largos (**Figura 27E**). Al analizar estas muestras por microscopía electrónica se ha observado que en presencia de VS2.18 se forman agregados de proteína amorfos (o polímeros desordenados), aunque no son muy abundantes en la muestra (**Figura 27F**). Cuando se añade el GTP a esta misma muestra, se observan los mismos manojos que aparecen en ausencia de ligando, aunque también se siguen observando algunos agregados de proteína. Estos resultados sugieren que la unión del compuesto al sitio de GTP estaría modificando ligeramente la formación de filamentos de FtsZ, alterando la dinámica de desensamblaje de los polímeros.

#### IV.2.2 Nuevos ligandos basados en VS2.18

Con el objetivo de encontrar nuevos compuestos que mantuviesen o, preferiblemente, mejorasen la afinidad de VS2.18 por la proteína y presentaran a su vez efecto antibacteriano, se decidió utilizar la estructura de VS2.18 para la búsqueda de compuestos con similitud química. Para ello se realizó una búsqueda basada en este ligando en las quimiotecas comerciales MolPort y Molecule. El criterio usado para seleccionar estos compuestos fue mantener el heterociclo del aminotiazol central y buscar modificaciones en los anillos de benceno externos. Se optó por este núcleo porque el resto de compuestos probados de esta serie, con núcleos distintos, no mostraron evidencias de unión en el sitio del GTP en BsFtsZ. Se escogieron moléculas que presentaban cambios en la disposición de

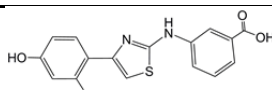
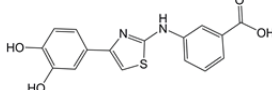
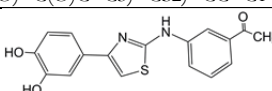
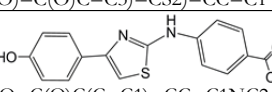
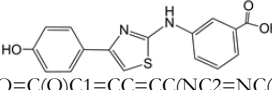
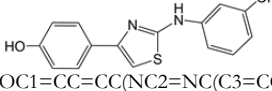
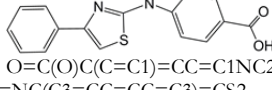
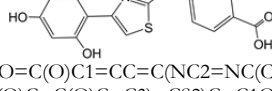
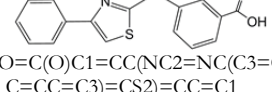
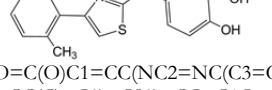
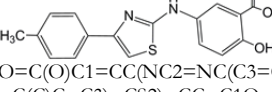


los OH, modificaciones en los anillos de benceno, y adición de otros grupos distintos, como metilo o carboxilo. En la **Tabla 9** se muestran las estructuras de esta nueva serie de compuestos seleccionados, junto con su solubilidad en el tampón Hepes, su afinidad por el sitio de unión del GTP en FtsZ determinada con el ensayo de desplazamiento de la sonda *mant*-GTP, y su efecto antibacteriano frente a la cepa silvestre *B. subtilis* 168. Las curvas de desplazamiento de la sonda fluorescente con estos ligandos se muestran en la **Figura 44** del **Material Suplementario**.

Es notable resaltar, en base a los resultados obtenidos con estos ligandos, que prácticamente todos ellos (a excepción del compuesto VS2.23) desplazan la sonda *mant*-GTP del sitio de unión del nucleótido en BsFtsZ. Además se observa una mejora con todos ellos en las afinidades por la diana respecto al compuesto parental VS2.18. Cabe destacar que el compuesto VS2.25, que presenta los mejores resultados de afinidad por la diana de toda la serie, presenta además actividad antibacteriana frente a la cepa silvestre *B. subtilis* 168 a una concentración de 100  $\mu$ M. Este dato es relevante, pues se trata del primer compuesto probado en el laboratorio proveniente de un cribado virtual con efecto antibacteriano y afinidad por la diana a la que va dirigido. La estructura de VS2.25 difiere de su análogo parental, con un solo grupo hidroxilo en cada uno de los anillos de benceno, en lugar de un grupo carboxilo en uno y dos grupos hidroxilo en el otro (VS2.18). No obstante, la pérdida de grupos OH en sus anillos externos también supone una disminución en la solubilidad de la molécula en el tampón acuoso, hecho que se ve reflejado en la tabla.

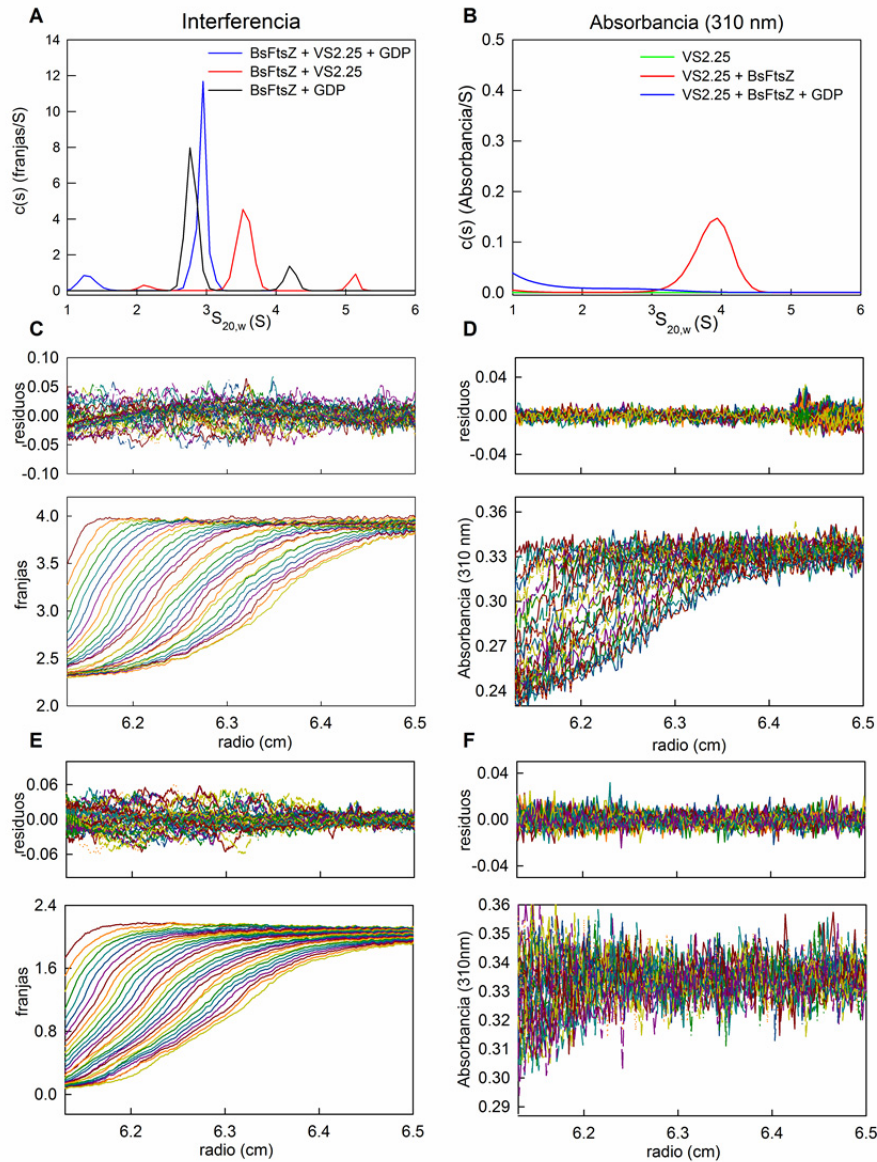
Los compuestos VS2.28 y VS2.29 también presentan efecto antibacteriano frente a esta misma cepa, pero a una concentración más elevada, 600  $\mu$ M y 400  $\mu$ M, respectivamente. Es por ello que no se tomaron en consideración para posteriores ensayos, y se seleccionó únicamente el compuesto VS2.25 por presentar el efecto antibacteriano más prometedor de la serie.

**Tabla 9. Nuevos inhibidores derivados del compuesto parental VS2.18.** Se muestra la estructura, nomenclatura y código SMILES de los compuestos, su solubilidad en el tampón experimental (Hepes, pH 6.8), las constantes de afinidad de unión a BsFtsZ, obtenidas en el ensayo de desplazamiento de *mant*-GTP, y su MIC en la cepa de *B. subtilis* 168. Compuesto VS2.18 añadido a modo de comparativa.

Compuestos (Nomenclatura, estructuras y códigos SMILES)	Solubilidad en Hepes (μM)	K <sub>d</sub> (μM)	MIC (μM) <i>B. subtilis</i> 168
VS2.18  <chem>O=C(O)C1=CC(NC2=NC(C3=C(O)C=C(O)C=C3)=CS2)=CC=C1</chem>	≥ 100	104 ± 38	>600
VS2.21  <chem>O=C(O)C1=CC(NC2=NC(C3=C(C(O)=C(O)C=C3)=CS2)=CC=C1</chem>	≥ 100	60 ± 7	> 600
VS2.22  <chem>O=C(C)C1=CC(NC2=NC(C3=C(C(O)=C(O)C=C3)=CS2)=CC=C1</chem>	100	~18	> 400
VS2.23  <chem>O=C(O)C(C=C1)=CC=C1NC2=NC(C(C=C3)=CC=C3O)=CS2</chem>	≥ 100	No desplaza	> 600
VS2.24  <chem>O=C(O)C1=CC=CC(NC2=NC(C(C=C3)=CC=C3O)=CS2)=C1</chem>	≥ 100	46 ± 4	> 600
VS2.25  <chem>OC1=CC=CC(NC2=NC(C3=CC=C(O)C=C3)=CS2)=C1</chem>	100	13 ± 1	100
VS2.26  <chem>O=C(O)C(C=C1)=CC=C1NC2=NC(C3=CC=CC=C3)=CS2</chem>	≥ 100	44 ± 6	> 200
VS2.27  <chem>O=C(O)C1=CC=C(NC2=NC(C3=C(C(O)=C(O)C=C3)=CS2)C=C1O</chem>	≥ 100	41 ± 5	> 400
VS2.28  <chem>O=C(O)C1=CC(NC2=NC(C3=C(C=CC=C3)=CS2)=CC=C1</chem>	≥ 100	49 ± 7	600
VS2.29  <chem>O=C(O)C1=CC(NC2=NC(C3=C(C(C)=CC(C)=C3)=CS2)=CC=C1O</chem>	≥ 100	38 ± 6	400
VS2.30  <chem>O=C(O)C1=CC(NC2=NC(C3=C(C=C(C)C=C3)=CS2)=CC=C1O</chem>	≈ 30	22 ± 3	> 400

#### IV.2.3 Unión de VS2.25 a FtsZ detectada por ultracentrifugación analítica

Igual que se ha hecho con otros compuestos, se quiso confirmar la unión de VS2.25 al sitio de unión de GTP en BsFtsZ con un ensayo de velocidad de sedimentación proteína - ligando mediante ultracentrifugación analítica (**Figura 28**). Se emplearon las mismas condiciones con las que se hizo el experimento de AUC con el compuesto VS2.18. En las condiciones en las que no se añadió VS2.25 o que con el compuesto se añadió también GDP, se observa una población mayoritaria que sedimenta con un coeficiente de sedimentación de 2.7 S, y que es compatible con un monómero de FtsZ. En la muestra que no lleva GDP y lleva el ligando VS2.25, se observa que la población sedimenta a una velocidad distinta,  $s_{20,w} = 3.5$  S, compatible con un dímero. El ligando co-sedimenta con BsFtsZ, y se observa que la sedimentación del compuesto, seguida por absorción a 305 nm, solapa con la velocidad de sedimentación de la proteína en estas condiciones. En base a estos resultados se interpreta que la unión del ligando a la proteína produce la formación de una población dimérica, y que esta unión es reversible, pues al añadir GDP en exceso (500  $\mu$ M de GDP frente a 30  $\mu$ M de VS2.25) esta situación se revierte y vuelve a monitorizarse una población mayoritaria que sedimenta a 2.7 S. Con el área bajo los picos se ha calculado que  $\sim 0.4$  de las moléculas de VS2.25 co-sedimentan por cada molécula de BsFtsZ. Como cabe esperar en el caso de una molécula pequeña, el compuesto sólo sin proteína no sedimenta en estas condiciones.



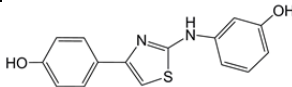
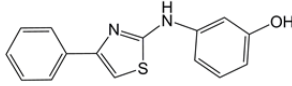
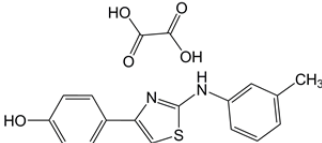
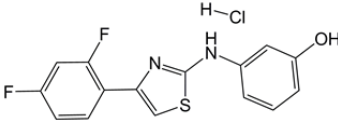
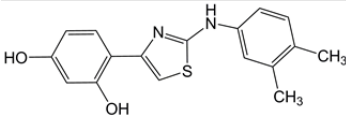
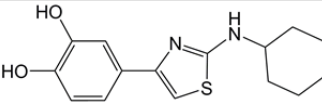
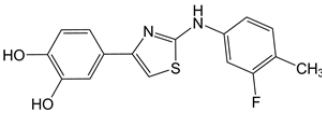
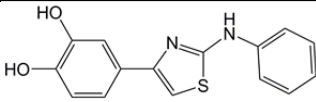
**Figura 28. Unión de VS2.25 a BsFtsZ determinado mediante un ensayo de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica.** **A.** Distribución de los coeficientes de sedimentación de la proteína  $c(s)$  medido con la óptica de interferencia de 15  $\mu\text{M}$  de BsFtsZ en presencia de 500  $\mu\text{M}$  de GDP (línea negra), en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de VS2.25 (línea roja), y en presencia de ambos, GDP y VS2.25, 500  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ , respectivamente, (línea azul). **B.** Distribución de los coeficientes de sedimentación del ligando medidos por absorbancia radial a 310 nm del compuesto solo (línea verde), en presencia de BsFtsZ (línea roja) y con BsFtsZ y GDP (línea azul). **C.** Barridos radiales sucesivos de interferencia de la distribución de BsFtsZ durante el experimento en presencia del ligando VS2.25. **D.** Barridos de la absorbancia radial a 310 nm que permiten seguir la co-sedimentación del ligando en el mismo experimento que en **C**. **E** y **F.** son las mismas medidas que **C** y **D** (respectivamente) pero en este caso con las muestras que además llevan GDP. En **F** se observa que el ligando no sedimenta con la proteína por acción del GDP. Se muestran también los residuos de los ajustes. Todos los ensayos han sido realizados en tampón Hepes (pH 6.8), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y 2 % de DMSO, a 25  $^{\circ}\text{C}$ .

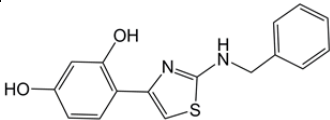
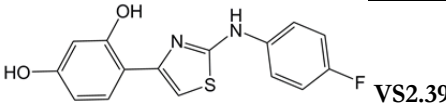
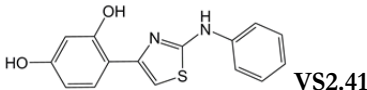
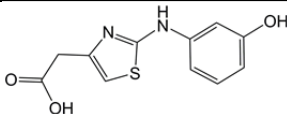
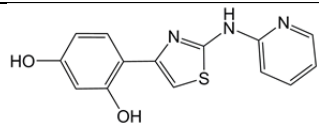
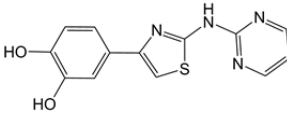
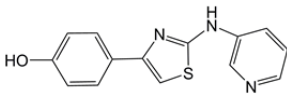
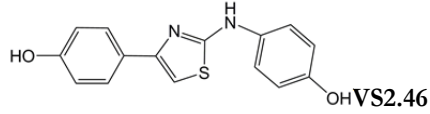
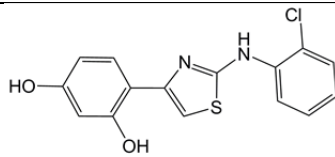
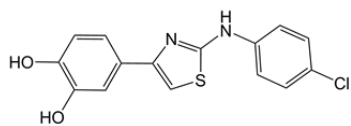
#### IV.2.4 Nuevos compuestos basados en VS2.18 y VS2.25

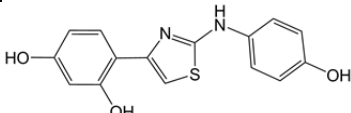
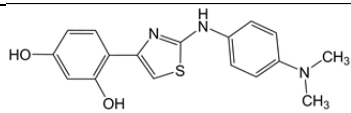
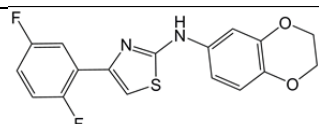
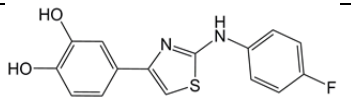
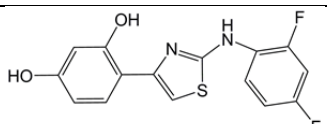
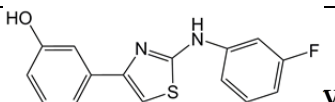
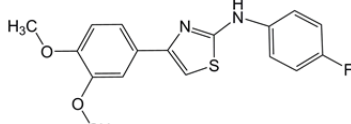
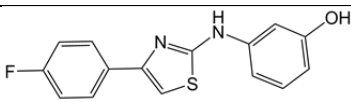
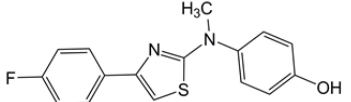
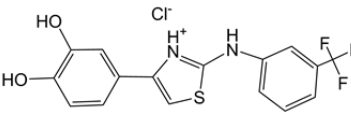
Dado el éxito con estos nuevos ligandos, decidimos realizar una nueva búsqueda de compuestos similares a VS2.18 y a VS2.25 en la que se tuvo en cuenta la información química obtenida a partir de los resultados con los compuestos anteriores. Inicialmente se identificaron 90 compuestos en la quimioteca MolPort con un valor de similitud con VS2.25 mayor de 0.6. Con estos compuestos se realizó un cribado virtual en el sitio del nucleótido y se eligieron los 32 compuestos que tenían la mejor puntuación (**Tabla 10**). Estos ligandos presentan variaciones respecto a VS25 pero mantienen el núcleo central aminotiazol, a excepción del compuesto VS2.59 con un metilimidazol como núcleo central. Este ligando se incluyó en la selección para explorar nuevas posibilidades químicas. El criterio de mantener el aminotiazol en el resto de compuestos de esta serie se debe a los buenos resultados en afinidad obtenidos con los compuestos VS2.21 - VS2.30, que suponen, en la mayoría de los casos, una mejora significativa respecto al compuesto parental. Sin embargo, no se eligieron compuestos con grupos COOH en los anillos externos, pues ninguno de los compuestos anteriores con este grupo presentaba una actividad antibacteriana aceptable, ni tampoco buenos valores de afinidad por la diana. Las variaciones escogidas fueron, principalmente, modificaciones en los sustituyentes de los anillos aromáticos externos que pudiesen aportar una mejora respecto al ligando parental. Por ejemplo, se sustituyeron grupos -OH por moléculas de -F, que son metabólicamente más estables. También se incluyó en la selección compuestos con algún otro sustituyente no probado anteriormente, como cloro.

Se estudió la unión de estos compuestos al sitio del GTP en BsFtsZ mediante el ensayo de desplazamiento de *mant*-GTP y se determinó su actividad antibacteriana en distintas cepas. Las curvas de desplazamiento de la sonda fluorescente con estos ligandos, se muestran en la **Figura 45** del **Material Suplementario**. De todos los compuestos de esta nueva serie (VS2.31 – VS2.62), únicamente el compuesto VS2.44 no es capaz de desplazar la sonda del sitio de unión de GTP en BsFtsZ. Con los compuestos VS2.38, VS2.42, VS2.43, VS2.45 y VS2.50 se realizó un ajuste aproximado de los resultados obtenidos con las pocas concentraciones probadas en el ensayo de desplazamiento de la sonda. Debido a que los valores de las MIC obtenidos con estos ligandos no son muy buenos ( $\geq 100 \mu\text{M}$  en todas las especies bacterianas probadas), no se profundizó en su estudio, y los valores de afinidad se muestran como un valor aproximado, pues serían necesarias más concentraciones para medir una  $K_d$ .

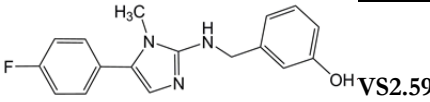
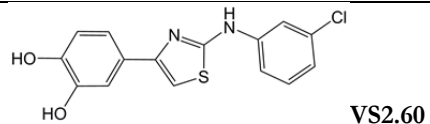
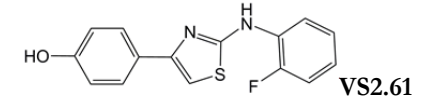
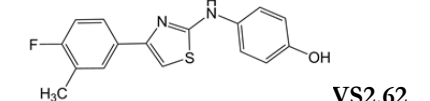
**Tabla 10. Nuevos compuestos análogos a VS2.18 y VS2.25, seleccionados a partir de un cribado en base a la estructura de estos ligandos.** Se muestran las estructuras, código SMILES, solubilidad en tampón Hepes, Kd de unión a BsFtsZ y MIC en las especies de *B. subtilis* 168, *E. coli* EnvA1 y *S. aureus* Mu50 (MRSA)

Estructura y código SMILES	Solubilidad (Hepes) (μM)	Kd (μM)	MIC (μM)		
			<i>B. subtilis</i> 168	<i>S. aureus</i> Mu50	<i>E. coli</i> EnvA 1
 <p><b>VS2.25</b></p> <chem>OC1=CC=CC(NC2=NC(C3=CC=C(O)C=C3)=CS2)=C1</chem>	100	13 ± 1	100	100	>200
 <p><b>VS2.31</b></p> <chem>OC1=CC=CC(NC2=NC(C3=CC=CC=C3)=CS2)=C1.Br</chem>	>150	18 ± 1	100	50	50
 <p><b>VS2.32</b></p> <chem>OC1=CC=C(C=C1)C2=CSC(NC3=CC(C)=CC=C3)=N2.O=C(O)C(O)=O</chem>	100	7.7 ± 0.6	50	50	>200
 <p><b>VS2.33</b></p> <chem>Cl[H].FC(C=C(F)C=C1)=C1C2=CSC(NC3=CC(O)=CC=C3)=N2</chem>	100	6.7 ± 0.4	50	20	50
 <p><b>VS2.34</b></p> <chem>CC1=C(C)C=C(NC2=NC(C3=C(O)C=C(O)C=C3)=CS2)C=C1</chem>	40	6.7 ± 0.4	20	50	>200
 <p><b>VS2.35</b></p> <chem>OC1=C(O)C=C(C2=CSC(NC3CCCCC3)=N2)C=C1</chem>	100	3.0 ± 0.1	50	50	50
 <p><b>VS2.36</b></p> <chem>CC1=C(F)C=C(NC2=NC(C3=CC(O)=C(O)C=C3)=CS2)C=C1</chem>	100	6.8 ± 0.9	20	20	>200
 <p><b>VS2.37</b></p> <chem>OC1=C(O)C=C(C2=CSC(NC3=CC=CC=C3)=N2)C=C1</chem>	>150	25 ± 1	100	50	>200

 <p><b>VS2.38</b></p> <chem>OC1=CC(O)=C(C2=CSC(NCC3=CC=CC=C3)=N2)C=C1</chem>	50	~ 77	100	200	>200
 <p><b>VS2.39</b></p> <chem>OC1=CC(O)=C(C2=CSC(NC3=CC=C(F)C=C3)=N2)C=C1</chem>	50-60	15 ± 1	50	50	100
 <p><b>VS2.41</b></p> <chem>OC1=CC(O)=C(C2=CSC(NC3=CC=CC=C3)=N2)C=C1</chem>	60	10 ± 1	100	50	200
 <p><b>VS2.42</b></p> <chem>O=C(O)CC1=CSC(NC2=CC(O)=CC=C2)=N1</chem>	>100	~ 83	>100	>200	>200
 <p><b>VS2.43</b></p> <chem>OC(C=CC1=CC=C(O)C=C1)=C1C2=CSC(NC3=CC=CC=N3)=N2</chem>	50	~ 37	100	100	>200
 <p><b>VS2.44</b></p> <chem>OC1=C(O)C=CC(C2=CSC(NC3=CC=CC=N3)=N2)=C1</chem>	50	No desplaza	>100	>200	>200
 <p><b>VS2.45</b></p> <chem>OC1=CC=C(C=C1)C2=CSC(NC3=CC=CC=N3)=N2</chem>	~100	~ 53	>100	>200	>200
 <p><b>VS2.46</b></p> <chem>OC1=CC=C(C=C1)NC2=NC(C3=CC=C(O)C=C3)=CS2</chem>	>150	18 ± 1	100	100	>200
 <p><b>VS2.47</b></p> <chem>OC(C=CC1=CC(O)=C(C=C1)C=C1)=C1C2=CSC(NC3=CC=CC=C3Cl)=N2</chem>	70	7.2 ± 0.5	50	50	>200
 <p><b>VS2.48</b></p> <chem>OC1=C(O)C=CC(C2=CSC(NC3=CC=C(Cl)C=C3)=N2)=C1</chem>	60	5.9 ± 0.3	20	20	50

 <p><b>VS2.49</b></p> <chem>OC(C=C(O)C=C1)=C1C2=CSC(NC(C=C3)=CC=C3O)=N2</chem>	100	$15 \pm 1$	>100	>200	>200
 <p><b>VS2.50</b></p> <chem>OC(C=C(O)C=C1)=C1C2=CSC(NC3=CC=C(N(C)C)C=C3)=N2</chem>	50	$\sim 33$	>100	>200	>200
 <p><b>VS2.51</b></p> <chem>FC1=CC(C2=CSC(NC3=CC4=C(C(=C3)OCOC4)=N2)=C(F)C=C</chem>	10	$8 \pm 1$	>200	$\sim 20$	>200
 <p><b>VS2.52</b></p> <chem>OC1=C(O)C=C(C2=CSC(NC3=CC=C(C(F)C=C3)=N2)C=C1</chem>	$\geq 100$	$14 \pm 1$	>200	50	>200
 <p><b>VS2.53</b></p> <chem>OC1=CC(O)=C(C2=CSC(NC3=C(F)C=C(C(F)C=C3)=N2)C=C1</chem>	$\sim 80-100$	$12 \pm 1$	100	100	200
 <p><b>VS2.54</b></p> <chem>OC1=CC(C2=CSC(NC3=CC(F)=CC=C3)=N2)=CC=C1</chem>	$\geq 100$	$10 \pm 1$	50	50	100
 <p><b>VS2.55</b></p> <chem>FC1=CC=C(C(C=C1)NC2=NC(C(C=C3OC)=CC=C3OC)=CS2</chem>	$\sim 20$	$\sim 18$	>200	>200	>200
 <p><b>VS2.56</b></p> <chem>FC1=CC=C(C(C=C1)C2=CSC(NC3=CC(O)=CC=C3)=N2</chem>	$\geq 100$	$6.5 \pm 1.2$	50	50	>100
 <p><b>VS2.57</b></p> <chem>FC1=CC=C(C(C=C1)C2=CSC(N(C)C3=CC=C(O)C=C3)=N2</chem>	10	$\sim 6$	>200	>200	>200
 <p><b>VS2.58</b></p> <chem>FC(F)(F)C1=CC(NC2=[NH+]C(C3=CC(O)=C(O)C=C3)=CS2)=CC=C1.[Cl-]</chem>	$\sim 100$	$2.5 \pm 0.6$	50	$\sim 20$	>100

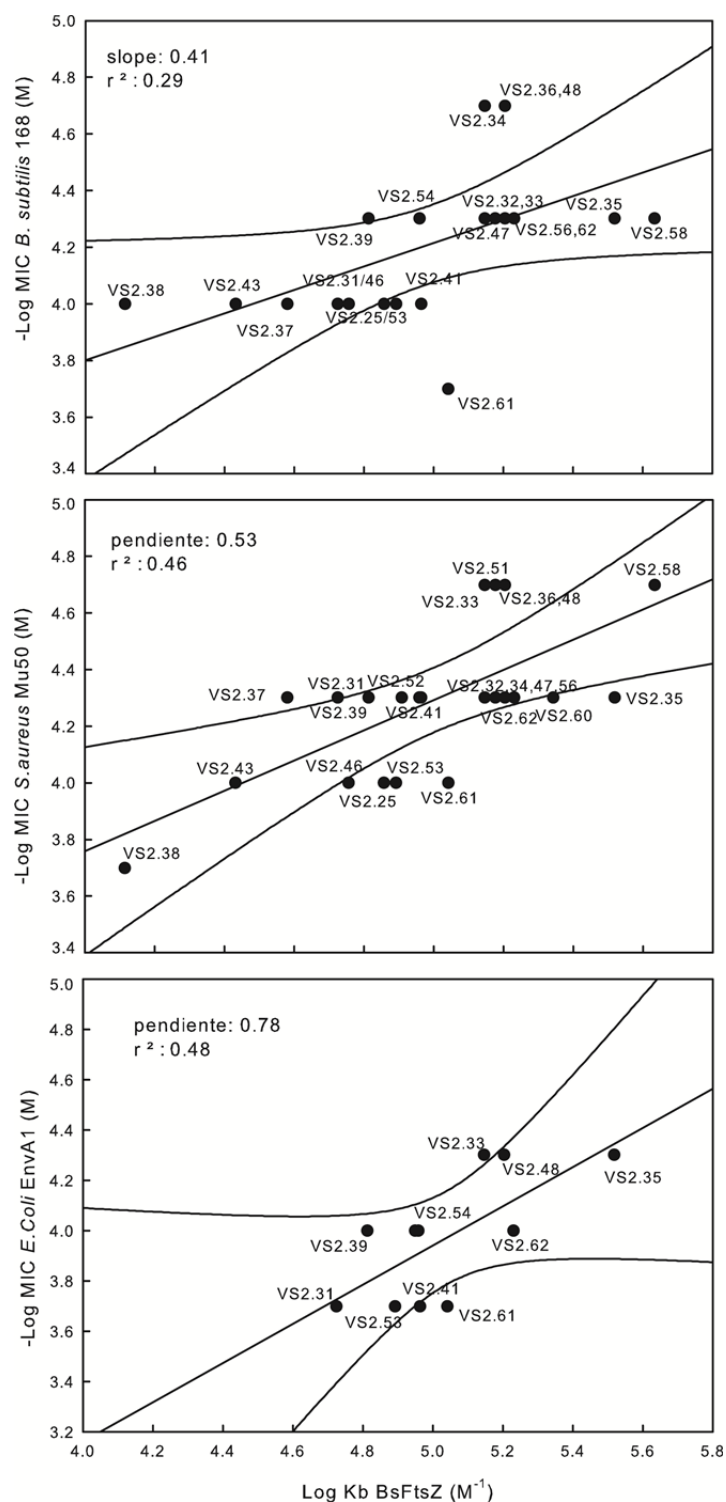


 <p><b>VS2.59</b></p> <chem>CN1C(NCC2=CC(O)=CC=C2)=NC=C1C3=CC=C(F)C=C3</chem>	10	~ 64	>200	>200	>200
 <p><b>VS2.60</b></p> <chem>OC1=C(O)C=CC(C2=CSC(NC3=CC=CC(Cl)=C3)=N2)=C1</chem>	≥100	4.4 ± 0.2	>200	50	>200
 <p><b>VS2.61</b></p> <chem>FC1=C(C=CC=Cl)NC2=NC(C3=CC=C(O)C=C3)=CS2</chem>	≥100	16 ± 9	200	100	200
 <p><b>VS2.62</b></p> <chem>FC1=C(C)C=C(C=C(Cl)C2=CSC(NC(C=C3)=CC=C3O)=N2)=C1</chem>	≥100	5.9 ± 0.3	50	50	100

Los ligandos que presentan mejores resultados en el ensayo de competición con la sonda por el sitio de unión de GTP en BsFtsZ son: VS2.31, VS2.32, VS2.33, VS2.34, VS2.35, VS2.36, VS2.39, VS2.41, VS2.46, VS2.47, VS2.48, VS2.49, VS2.51, VS2.52, VS2.53, VS2.54, VS2.56, VS2.58, VS2.60, VS2.61 y VS2.62 (**Tabla 10**), todos ellos con una  $K_d < 20 \mu\text{M}$ . En la mayoría de los casos, la afinidad de estos ligandos por el sitio de unión es muy similar a la obtenida con el ligando parental VS2.25 ( $K_d = 13 \pm 1 \mu\text{M}$ ). No obstante, todos los compuestos de esta nueva serie presentaron una afinidad por su sitio de unión en FtsZ mayor que la de VS2.18 ( $K_d = 104 \pm 38 \mu\text{M}$ ).

Se observó también una clara mejoría en la actividad antibacteriana frente a *B. subtilis* 168 con estos nuevos ligandos: 20  $\mu\text{M}$  en el caso de VS2.34, VS2.36 y VS2.48, y 50  $\mu\text{M}$  con los compuestos VS2.32, VS2.33, VS2.35, VS2.39, VS2.47, VS2.54, VS2.56, VS2.58 y VS2.62. Aunque ninguno de los ligandos presentó actividad antibacteriana frente a la cepa silvestre de *E. coli* a concentraciones inferiores de 200  $\mu\text{M}$  (datos no mostrados), algunos resultaron ser efectivos frente a la cepa permeabilizada de *E. coli* (EnvA1) a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  (VS2.31, VS2.33, VS2.35 y VS2.48) y frente a la cepa multiresistente a metilicina de *S. aureus* (Mu50) a concentración de 20  $\mu\text{M}$  (VS2.33, VS2.36, VS2.48, VS2.51 y VS2.58). La afinidad de los ligandos por el sitio de unión del GTP en BsFtsZ se correlacionó con la actividad antibacteriana en las tres cepas (*B. subtilis* 168, *S. aureus* Mu50 (MRSA) y *E. coli* permeabilizada (EnvA1)) (**Figura 29**). En las tres gráficas de afinidad – actividad antibacteriana, se observa que los compuestos que presentan mayor

afinidad por el sitio de unión en FtsZ son también las que, en general, mejor actividad antibacteriana presentan en las tres cepas probadas.



**Figura 29. Relación entre la afinidad y la actividad antibacteriana.** Se muestra la afinidad de los compuestos por el sitio de unión del GTP en BsFtsZ (expresada en Kb) y su actividad antibacteriana en tres cepas distintas (*B. subtilis* 168, *S. aureus* Mu50 (MRSA) y *E. coli* permeabilizada (EnvA1). Las líneas se corresponden al ajuste linear por mínimos cuadrados y al intervalo de confianza del 95%.

#### IV.2.5 Perfil citológico de los inhibidores de FtsZ

Para tratar de entender el mecanismo de acción antibacteriano de los inhibidores, se realizó un estudio de su perfil citológico en *B. subtilis*, siguiendo un trabajo reciente de nuestro laboratorio en el que se describen los cambios citológicos que causan los inhibidores de FtsZ (Araújo-Bazán *et al.*, 2016). El análisis del perfil citológico permite diferenciar los inhibidores de FtsZ de otros de antibióticos con distintos mecanismos de acción. A diferencia del proyecto anterior de esta Tesis (capítulo IV.1.), aquí se ha estudiado más a fondo el efecto de los compuestos en el nucleóide y en la integridad de la membrana celular, así como en la localización subcelular de FtsZ.

En primer lugar, se ha estudiado la morfología celular de *B. subtilis* 168 en presencia de aquellos compuestos con los que se obtuvo inhibición del crecimiento celular en *B. subtilis* (Tabla 10) y se incluyó además el compuesto VS2.25, por ser el único compuesto de la serie anterior que presentaba efecto antibacteriano a 100  $\mu$ M (Tabla 9). Inicialmente los compuestos se probaron a la misma concentración que la MIC. Aquellos compuestos que a esa concentración tenían un efecto tóxico a las 3 h de incubación, se probaron a concentraciones más bajas (Tabla 11).

Tras la incubación con los compuestos, se midió la longitud de las células a partir de las imágenes obtenidas. Según el trabajo de Araújo-Bazán *et al.*, 2016, para que un compuesto pueda ser considerado un inhibidor selectivo del divisoma, la longitud de las células tratadas con dicho compuesto debe ser, al menos, 3 veces la longitud de las células control. Según este criterio, los compuestos VS2.25 (100  $\mu$ M) y VS2.33 (50  $\mu$ M), VS2.54 (25  $\mu$ M), VS2.61 (50  $\mu$ M) y VS2.62 (25  $\mu$ M), mostraron un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la filamentación bacteriana de *B. subtilis* 168 en comparación con la muestra control (Figura 30D). De todos estos inhibidores, los ligandos VS2.25 y VS2.33, además, incrementan la longitud de las células 3.1 – 3.2 veces respecto al control (Figura 30A – C), y se ha considerado que su efecto en la elongación celular es relevante, ya que supera el criterio establecido en Araújo-Bazán *et al.*, 2016. Sin embargo, este efecto en filamentación es más débil que el que se observó con el compuesto sintético UCM81 (capítulo anterior), que produce un aumento en la longitud celular de hasta 9 veces. Con el resto de ligandos de esta serie no se observó filamentación celular. Se ha determinado que los compuestos VS2.48 y VS2.58 no filamentos las células, pero sí producen *foci* en células de *B. subtilis* SU570 a una concentración de 10  $\mu$ M y 12.5  $\mu$ M, respectivamente. En la Figura 30D se

muestra el efecto de los compuestos que inducen la filamentación celular y algunos de los que no presentan este efecto, a modo de comparación.

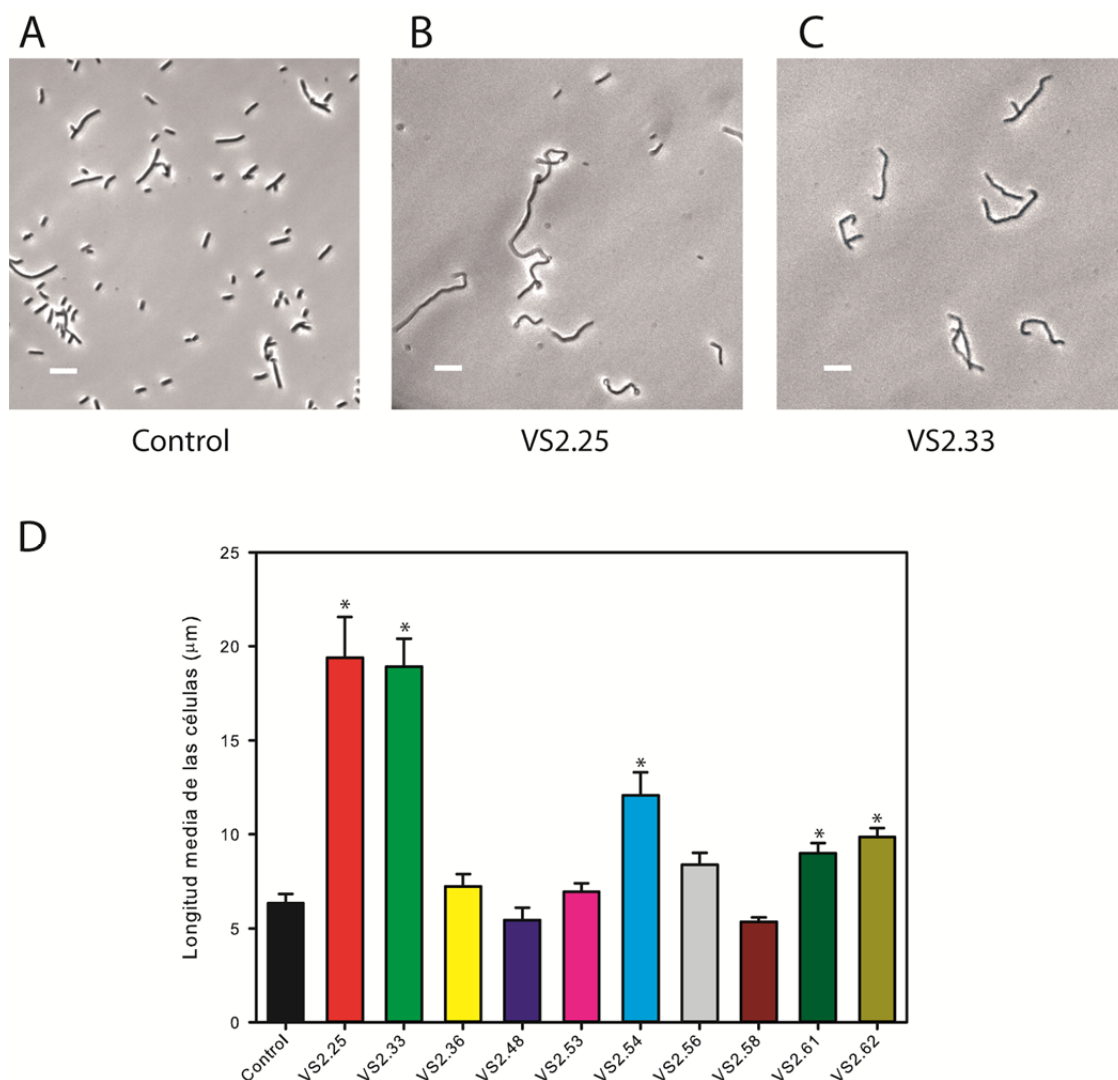
**Tabla 11. Efecto de los compuestos en la morfología de *B. subtilis* 168 y en la localización del anillo Z en *B. subtilis* SU570.** Entre paréntesis se indican las concentraciones a las que se han probado los compuestos. El tiempo de incubación de los compuestos con la cepa *B. subtilis* 168 es de 3h a 37 °C y con *B. subtilis* SU570 es de 1.5 horas a 30 °C. \* Se observó lisis a esa concentración. Por debajo de esa concentración el compuesto no filameta las células.

Compuesto	Efecto en división de <i>B. sub.</i> 168 (μM)	Efecto en <i>B. sub.</i> SU570 (μM)	Compuesto	Efecto en división de <i>B. sub.</i> 168 (μM)	Efecto en <i>B. sub.</i> SU570 (μM)
<b>VS2.25</b>	Filamenta (100)	Muchos <i>foci</i> (50)	<b>VS2.43</b>	No (100)*	No (50)
<b>VS2.31</b>	No (100)*	No (50)	<b>VS2.46</b>	No (100)*	No (50)
<b>VS2.32</b>	No (50)*	No (25)	<b>VS2.47</b>	No (50)*	No (25)
<b>VS2.33</b>	Filamenta (50)	<i>Foci</i> (20)	<b>VS2.48</b>	No (20)*	<i>Foci</i> (10)
<b>VS2.34</b>	No (20)*	No (10)	<b>VS2.53</b>	No (100)*	No (50)
<b>VS2.35</b>	No (50)*	No (25)	<b>VS2.54</b>	Filamentación débil (25)	No (12.5)
<b>VS2.36</b>	No (20)*	<i>Foci</i> (20)	<b>VS2.56</b>	No (50)*	No (25)
<b>VS2.37</b>	No (100)*	No (50)	<b>VS2.58</b>	No (25)*	<i>Foci</i> y deslocaliz. anillo Z (12.5)
<b>VS2.38</b>	No (100)*	No (50)	<b>VS2.61</b>	Filamentación débil (50)	No (50)
<b>VS2.39</b>	No (50)*	No (25)	<b>VS2.62</b>	Filamentación débil (25)	<i>Foci</i> y deslocaliz. anillo Z (25)
<b>VS2.41</b>	No (100)*	No (50)			

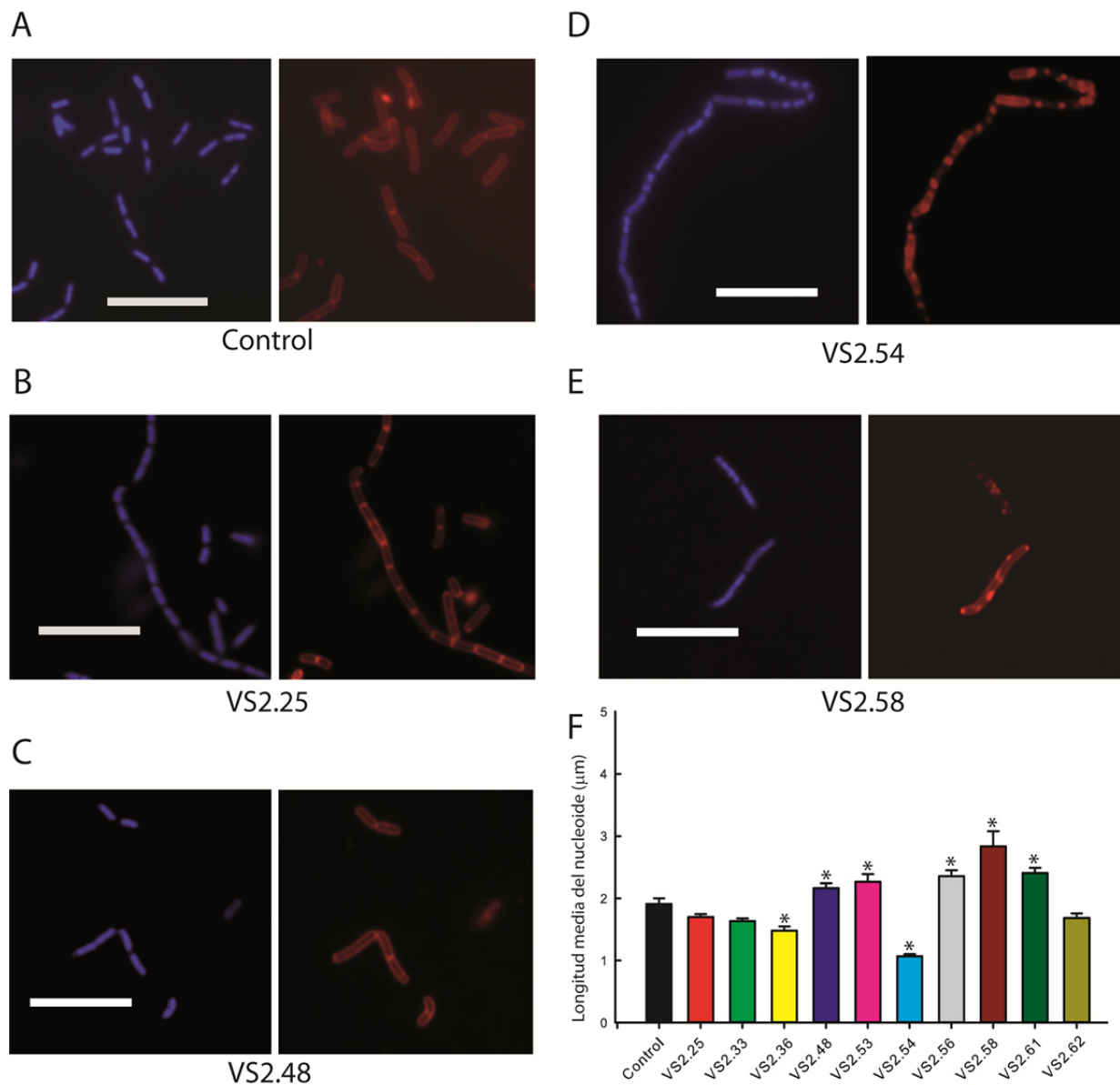
En segundo lugar, se quiso estudiar si aquellos compuestos con los que se cuantificó la filamentación afectaban la integridad de la membrana celular y/o la morfología del nucleoide. Para ello, se reprodujeron las condiciones del ensayo anterior y, después de la incubación (3 h) con los compuestos, se tiñeron las células con los colorantes vitales FM4-64 (membrana) y DAPI (nucleoide). Se tomaron imágenes de la membrana y del nucleoide y se midió la longitud de éste último (**Figura 31**). Con los compuestos VS2.54 y VS2.58 se observaron acumulaciones de membrana (**Figura 31D-E**), mientras que con el resto de inhibidores no se observaron alteraciones significativas en la membrana. Esto se comprobó estudiando la viabilidad celular con el kit *LIVE/DEAD*, que se basa en dos agentes fluorescentes que tiñen las células y permiten discriminar la población de células con la

membrana intacta de aquellas con la membrana permeabilizada. Con este ensayo se determinó que, a las concentraciones probadas en el ensayo de filamentación, no se está comprometiendo la integridad de la membrana celular de las células observadas, puesto que más del 95 % de las células estaban vivas, salvo en presencia de VS2.58, que reducía este número al 88 %. En lo que respecta al nucleoide, los compuestos VS2.48, VS2.53, VS2.56, VS2.58 y VS2.61, causan una leve elongación del mismo mientras que en presencia de los compuestos VS2.36 y VS2.54 las células presentan un nucleoide de menor tamaño (**Figura 31A-E**). Con los compuestos VS2.25, VS2.33 y VS2.62 no se observaron diferencias significativas respecto al control en cuanto a cambios en el tamaño del nucleoide (**Figura 31F**).

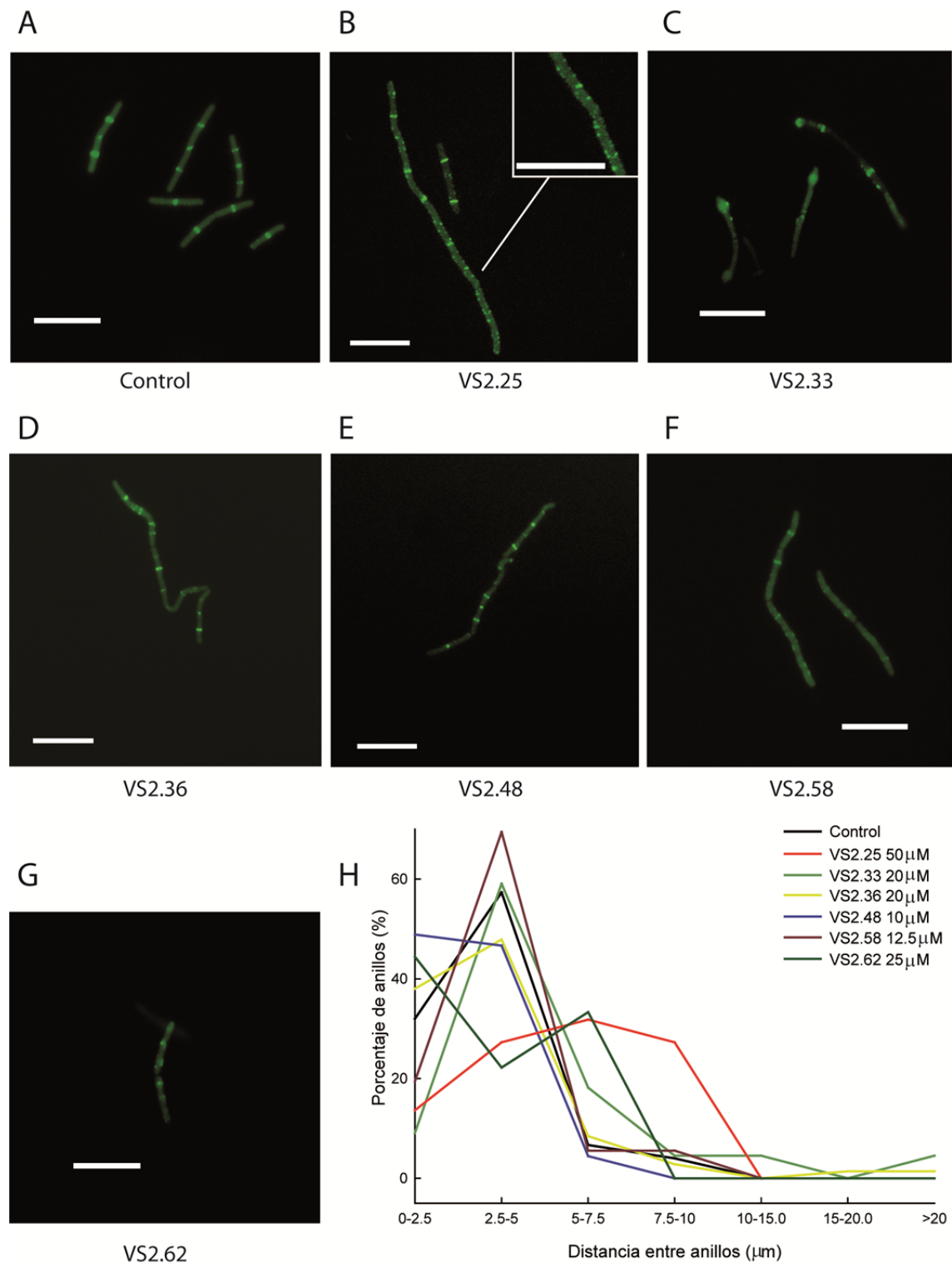
Para completar el estudio del perfil citológico se analizó el efecto de los compuestos en la localización subcelular de FtsZ. Los compuestos se ensayaron a una concentración por debajo de la MIC (determinada en *B. subtilis* 168) dado que la cepa utilizada en este ensayo (*B. subtilis* SU570) es más sensible a los inhibidores de FtsZ que la cepa silvestre. Después de la incubación de las células de *B. subtilis* SU570 con los compuestos, tan sólo se observó la formación de *foci* de FtsZ en presencia de VS2.25 (50  $\mu$ M), VS2.33 (20  $\mu$ M), VS2.36 (10  $\mu$ M), VS2.48 (10  $\mu$ M), VS2.58 (12.5  $\mu$ M) y VS2.62 (25  $\mu$ M) (Tabla 10 y **Figura 32A– G**). Para determinar la distribución de los anillos a lo largo de la célula se midió la distancia entre anillos y se observó que en presencia de los compuestos VS2.25, VS2.33 y VS2.62 la distancia entre anillos aumenta en comparación con el control (**Figura 32H**). Es curioso señalar que, en presencia del ligando VS2.33 algunas células aparecen deformadas, coincidiendo con la zona en la que también se observa acumulación de FtsZ (**Figura 32C**).



**Figura 30. Efecto de los ligandos en la división celular de *B. subtilis* 168.** (A-C) Imágenes de microscopía por contraste de fases de la cepa *B. subtilis* 168 en presencia de aquellos compuestos que presentan un efecto más relevante en la filamentación celular. **A.** Control en ausencia de compuesto **B.** VS2.25 a 100 μM **C.** VS2.33 a 50 μM. Barras de escala: 10 μm. **D.** Longitud media de las células después de su incubación durante 3 h a 37 °C en presencia de VS2.25 a 100 μM, VS2.33 a 50 μM, VS2.36 a 20 μM, VS2.48 a 20 μM, VS2.53 a 25 μM, VS2.54 a 25 μM, VS2.56 a 25 μM, VS2.58 a 25 μM, VS2.61 a 50 μM, VS2.62 a 25 μM y un control sin compuesto. \* ( $p < 0.05$ )



**Figura 31. Efecto de los compuestos en la membrana celular y en el nucleóide en células de *B. subtilis* 168 observado por microscopía de fluorescencia.** Se muestran las imágenes del efecto de los compuestos en el nucleóide (canal azul) y en la membrana celular (canal rojo) de los compuestos: **A.** Control; **B.** VS2.25 a 100 μM; **C.** VS2.48 a 20 μM, **D.** VS2.54 a 25 μM; y **E.** VS2.58 a 25 μM durante 3 h a 37 °C. Antes de visualizar las células se tiñeron durante 10 minutos con 0.25 μg/mL de DAPI y 1 μg/mL de FM4-64 (tinción de nucleóide y membrana celular, respectivamente). Barras de escala: 10 μm. **F.** Longitud del nucleóide en células tratadas con los mismos compuestos que se muestran en la Figura 27D, entre los cuales están aquellos que dieron resultados positivos en filamentación. \*( $p < 0.05$ )



**Figura 32.** Efecto de los compuestos en la localización subcelular de FtsZ. **A.** Imágenes de microscopía de fluorescencia de la cepa *B. subtilis* SU570 en presencia de los inhibidores. **A.** Control; **B.** VS2.25 (50 μM); **C.** VS2.33 (20 μM); **D.** VS2.36 (20 μM); **E.** VS2.48 (10 μM); **F.** VS2.58 (12.5 μM); y **G.** VS2.62 (25 μM). Las muestras se incubaron con los compuestos durante 1,5 h a 30 °C. Barra de escala: 10 μm. **H.** Medida de la distancia entre anillos Z en células incubadas en presencia de VS2.25 (50 μM), VS2.33 (10 y 20 μM), VS2.36 (10 y 20 μM), VS2.48 (10 μM), VS2.58 (12.5 μM), VS2.62 (25 μM) y un control sin compuesto. En el eje de ordenadas se representa el porcentaje de anillos separados la distancia indicada en el eje de abscisas. Se han incluido únicamente las medidas de los compuestos que mostraron un efecto en la localización del anillo Z (Tabla 9).



#### IV.2.6 Toxicidad de los inhibidores de FtsZ en líneas celulares humanas

Estos ensayos se llevaron a cabo gracias a la colaboración con la Dra. Isabel Barasoain Blasco, del laboratorio de Agentes Estabilizantes de Microtúbulos del CIB.

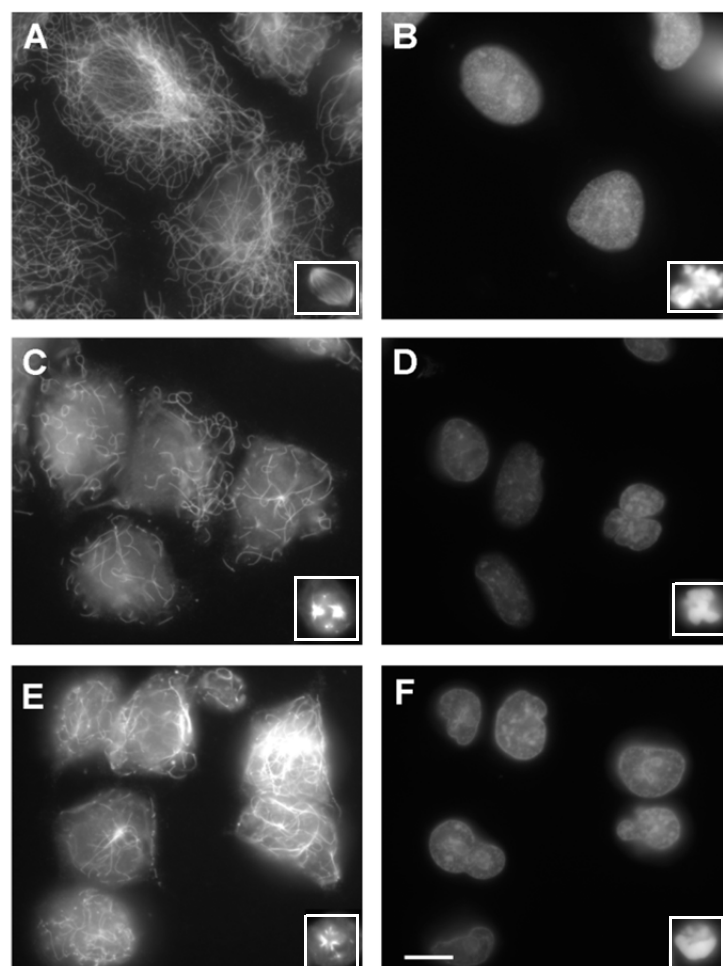
Se escogieron algunos de los compuestos de mayor interés dados los resultados anteriores para estudiar su efecto citotóxico en dos líneas celulares humanas (**Tabla 12**). Además, sólo el compuesto VS2.58 se probó en un ensayo de inmunofluorescencia con células A549 (carcinoma de pulmón) y se vio que en esta línea produce células redondeadas características de parada mitótica (**Figura 33**). Con el compuesto VS2.58, la IC<sub>50</sub> en la línea celular IMR90 no se pudo determinar por insuficiente cantidad de compuesto.

**Tabla 12. Resultados de las pruebas de toxicidad, IC<sub>50</sub>, en distintas líneas de células de mamífero.** A549 es una línea celular humana de carcinoma de pulmón, mientras que IMR90 es una línea celular de fibroblastos de pulmón.

Compuesto	IC <sub>50</sub> A549 ( $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> IMR90 ( $\mu$ M)
<b>Paclitaxel</b>	0.004	ND
<b>VS2.25</b>	41 $\pm$ 5	75 $\pm$ 21
<b>VS2.33</b>	32 $\pm$ 2	53 $\pm$ 1
<b>VS.36</b>	23 $\pm$ 1	76 $\pm$ 20
<b>VS2.48</b>	19 $\pm$ 3	75 $\pm$ 21
<b>VS2.54</b>	38 $\pm$ 1	76 $\pm$ 20
<b>VS2.58</b>	24	ND

El resto de compuestos ensayados en la inmunofluorescencia indirecta con la línea celular humana de carcinoma de pulmón A549, no redondearon las células ni se observó un efecto de parada mitótica, por lo que no se han considerado inhibidores del ciclo celular eucariota ni se cree que afecten al ensamblaje de los microtúbulos, en estas líneas celulares humanas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el efecto citotóxico inespecífico sobre

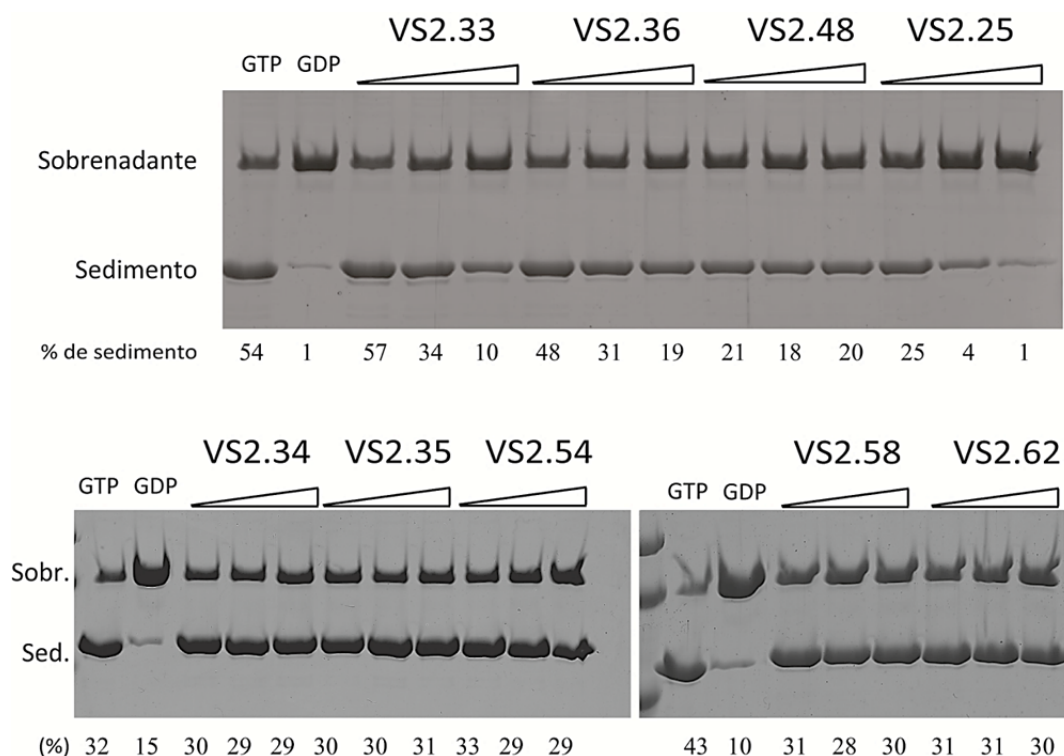
las células humanas a concentraciones semejantes a la MIC sobre bacterias podría dejar, en principio, poca ventana de concentración para su utilización como agentes antimicrobianos.



**Figura 33. Inmunofluorescencia de células A549 (carcinoma de pulmón) con VS2.58 a 10 y 20  $\mu$ M.** Las células A549 se incubaron 24 horas en presencia de DMSO (A, B), con VS2.58 a 10  $\mu$ M (C, D), y con VS2.58 a 20  $\mu$ M (E, F). Los microtúbulos A, C y E se marcaron con el anticuerpo monoclonal DM1A contra  $\alpha$ -tubulina mientras que el ADN (B, D y F) se marcó con Hoechst 33342. Los insertos muestran los husos mitóticos de las mismas preparaciones. La barra en F. representa 10  $\mu$ m. Todos los paneles y los insertos tienen el mismo aumento.

#### IV.2.7 Modulación del ensamblaje de FtsZ por los inhibidores

A partir de los resultados citológicos, y con independencia del potencial antibacteriano de estos ligandos, se decidió estudiar mecánicamente cómo interaccionan estos compuestos con la diana FtsZ. Esto puede proporcionar información valiosa tanto para entender el mecanismo de unión como para el desarrollo posterior de nuevos inhibidores. Se estudió bioquímicamente la formación de polímeros *in vitro* de BsFtsZ en presencia de los compuestos en unas condiciones parecidas a las fisiológicas, esto es, con un aporte continuo de GTP. Por ello se realizó un ensayo de sedimentación de polímeros en presencia de 50  $\mu$ M GTP y de un sistema de regeneración de nucleótido.

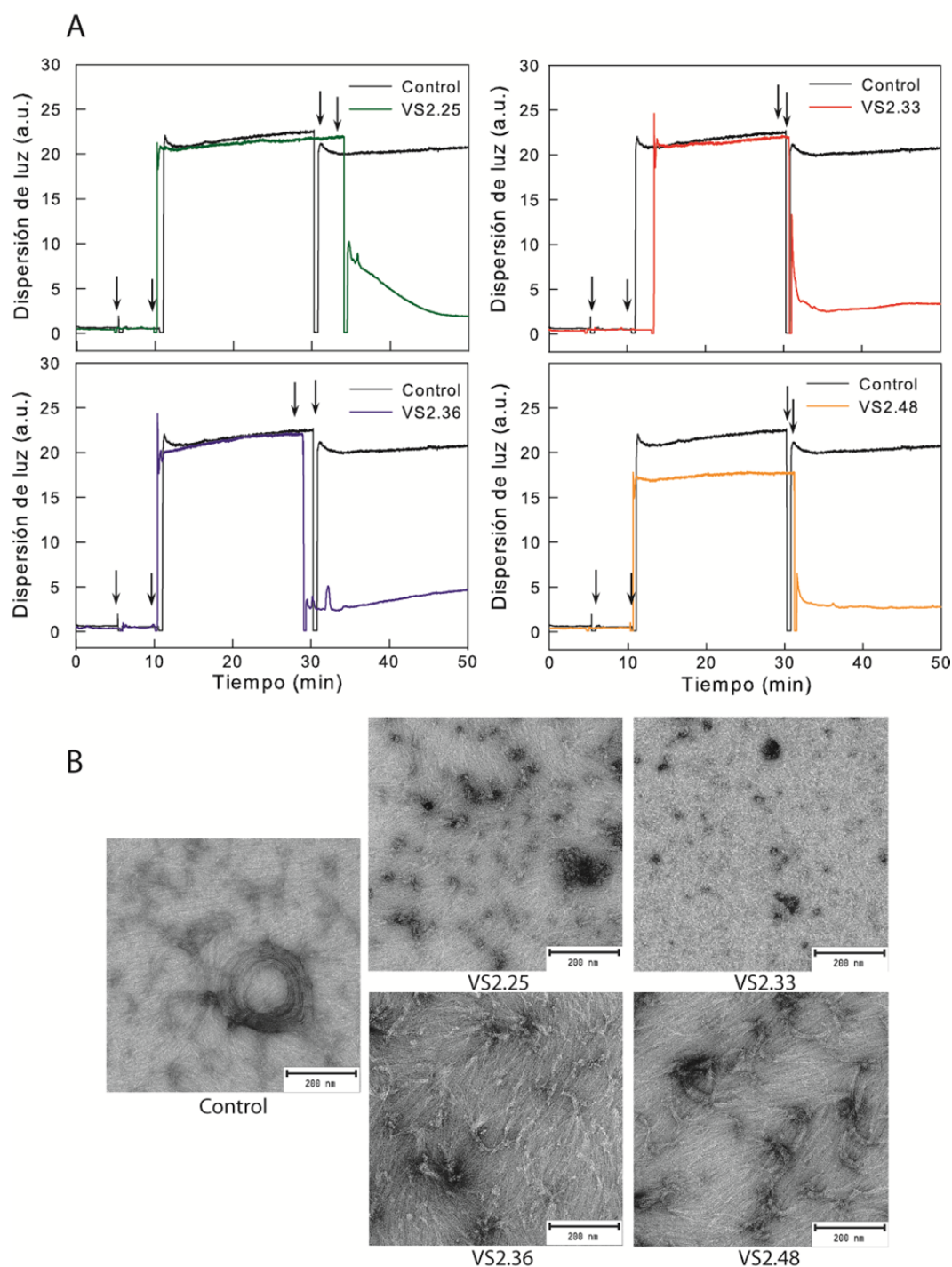


**Figura 34. Ensamblaje de BsFtsZ en presencia de los ligandos VS2.25, VS2.33, VS2.34, VS2.35, VS2.36, VS2.48, VS2.58.** Gel PAGE-SDS con las muestras resultantes de la sedimentación de polímeros de BsFtsZ (10  $\mu$ M) en presencia de los compuestos a tres concentraciones: 50, 100 y 200  $\mu$ M, en tampón Hepes, 10 mM  $MgCl_2$ , 2 % DMSO, 50  $\mu$ M de GTP y un sistema de regeneración de nucleótido (SR). Se muestra un control negativo, con 2 mM de GDP (sin SR), y un control positivo sin compuesto. Se muestran los porcentajes de proteína detectada en el sedimento en relación a la proteína total en cada uno de los carriles.

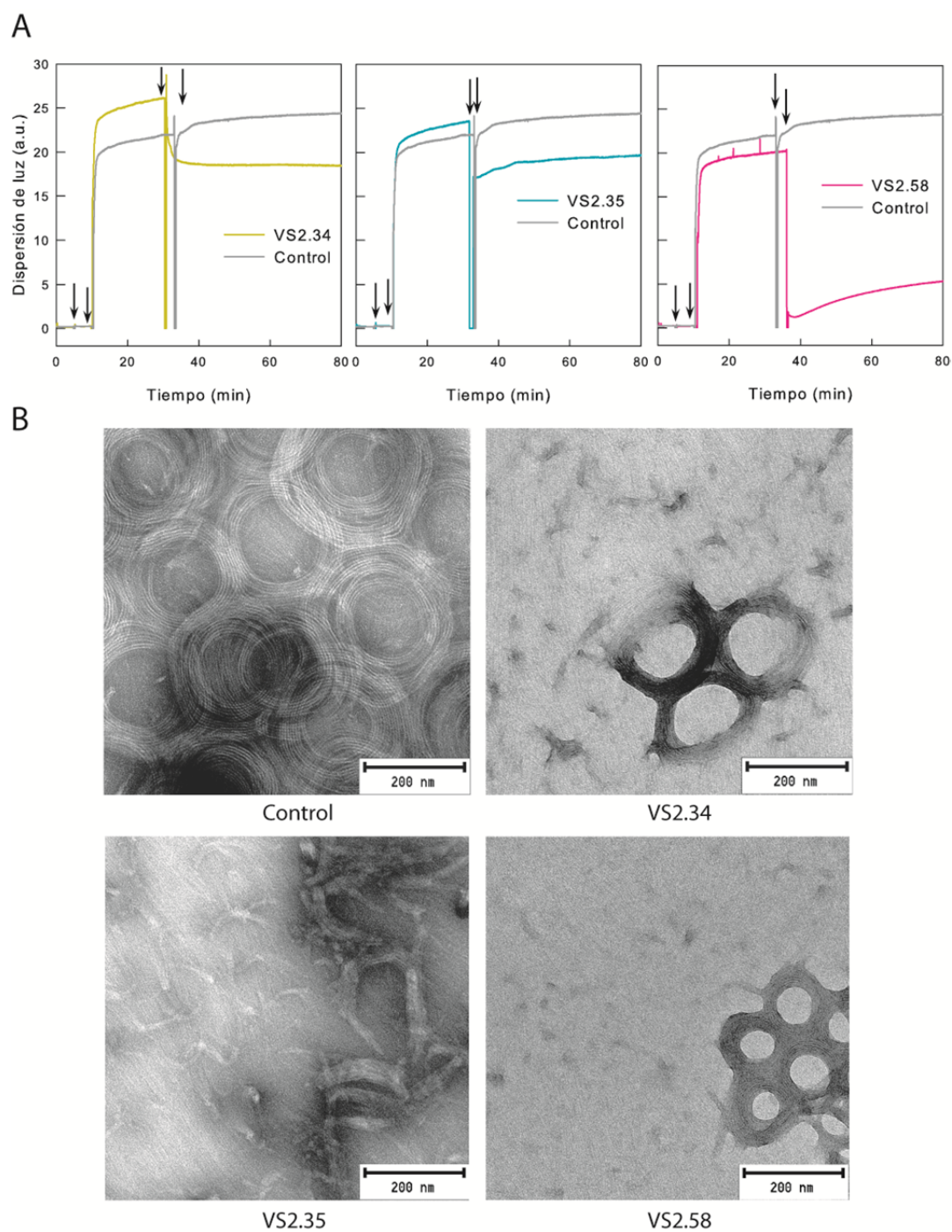
En primer lugar se realizó un ensayo de sedimentación de los polímeros de BsFtsZ en presencia de los compuestos. De entre todos los compuestos, VS2.25, VS2.33, VS2.34, VS2.35, VS2.36, VS2.48 y VS2.58, son los que mostraron los resultados más significativos en la inhibición de la polimerización de BsFtsZ en estas condiciones (**Figura 34**). El porcentaje de inhibición del ensamblaje de BsFtsZ para cada compuesto se ha calculado según la ecuación (13) del apartado de **Materiales y Métodos**. Hay que hacer especial hincapié en el compuesto VS2.25, que a la máxima concentración probada (200  $\mu$ M) mostró el mayor efecto en la inhibición de la polimerización (99 % de inhibición) respecto al resto de inhibidores con resultados significativos, VS2.33 y VS2.36 con un porcentaje de inhibición de 83% y 66%, respectivamente. VS2.34, VS2.35 y VS2.54 inhiben poco la polimerización de BsFtsZ (<20% de inhibición), y VS2.48, VS2.58 y VS2.62 producen un efecto moderado (36 - 39% de inhibición).

Este resultado se complementó con un ensayo en el que se sigue la cinética de polimerización de la proteína mediante dispersión de luz en las mismas condiciones que en el ensayo de sedimentación de polímeros. Una vez que la proteína hubo ensamblado en presencia de GTP y un sistema de regeneración, se añadieron 100  $\mu$ M del ligando. Como control se midió el ensamblaje de una muestra en la que, en lugar de añadir ligando, se añadió un 2 % de DMSO (**Figura 34 y 35**). Este ensayo se hizo con los ligandos VS2.25, VS2.33, VS2.36, VS2.48 (**Figura 34A**), VS2.34, VS2.35 y VS2.58 (**Figura 35A**). Lo que se observó es una reducción notable en la dispersión de luz al añadir VS2.25, VS2.33, VS2.36, VS2.48 (**Figura 34A**) y VS2.58 (**Figura 35A**), en comparación con el control en el que se añade sólo DMSO, indicativo de una inhibición en la polimerización de BsFtsZ. Al añadir los compuestos VS2.34 y VS2.35, la bajada en la luz dispersada es menor a la que se registró con el resto de inhibidores.

Adicionalmente, se observaron los polímeros que BsFtsZ forma en presencia de estos compuestos, por microscopía electrónica (**Figuras 34B y 35B**). Las imágenes muestran como los ligandos VS2.25, VS2.33, VS2.36 y VS2.48 disminuyen la cantidad de polímeros formados, observándose la desaparición de toroides y manojos de polímeros que BsFtsZ forma en estas condiciones, como se puede observar en la muestra control. En presencia de VS2.25, VS2.33 y VS2.58 se observa la formación de otro tipo de agregados, con una morfología desordenada que no se observan en el control. En estas muestras además, se observa un fondo en el que aparecen filamentos sencillos y desaparecen los manojos abundantes que sí se identifican en la muestra control.



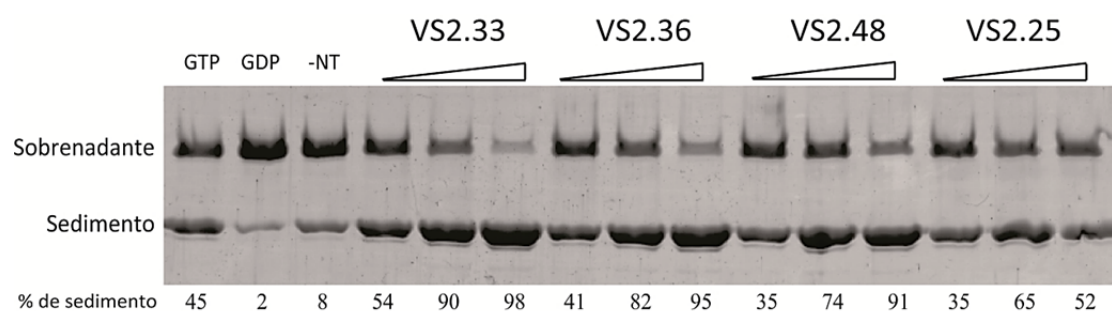
**Figura 34. Efecto de los compuestos VS2.25, VS2.33, VS2.36 y VS2.48 en la polimerización de BsFtsZ. A.** Ensayos de dispersión de luz con 10  $\mu\text{M}$  de BsFtsZ en presencia de GTP (50  $\mu\text{M}$ ) y sistema de regeneración del nucleótido (SR). Las flechas indican la adición en el siguiente orden de: 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 50  $\mu\text{M}$  GTP y 100  $\mu\text{M}$  de compuesto, o bien DMSO en la muestra control (línea negra). **B.** Micrografías electrónicas de muestra tomadas después de la adición de los compuestos en las cinéticas mostradas en A. Barra de escala: 200 nm.



**Figura 35. Efecto de los compuestos VS2.34, VS2.35 y VS2.58 en la polimerización de BsFtsZ.** **A.** Ensayos de dispersión de luz con 10  $\mu\text{M}$  de BsFtsZ en presencia de GTP (50  $\mu\text{M}$ ) y sistema de regeneración del nucleótido (SR). Las flechas indican la adición en el siguiente orden de: 10 mM  $\text{Mg}^{2+}$ , 50  $\mu\text{M}$  GTP y 100  $\mu\text{M}$  de compuesto, o bien DMSO en la muestra control (línea negra). **B.** Micrografías electrónicas de muestra tomadas después de la adición de los compuestos en las cinéticas mostradas en A. Barra de escala: 200 nm.



Se realizó un segundo ensayo de sedimentación de polímeros de FtsZ en ausencia de nucleótido. Como controles se prepararon muestras con 1 mM de GTP, una muestra sin nucleótido y una muestra con 1 mM de GDP. Este ensayo se hizo con todos los compuestos de la serie, pero sólo se muestran aquellos con el mayor efecto. En estas condiciones se observa un aumento de la cantidad de sedimento con todos los compuestos a la máxima concentración probada, 100  $\mu$ M (**Figura 36**). Con este porcentaje se calculó el porcentaje agregación (% sedimento con el compuesto - % sedimento sin nucleótido). Este efecto fue más significativo con los ligandos VS2.33, VS2.36 y VS2.48, con un porcentaje de 90 %, 87% y 83 %, respectivamente. Por microscopía se observó la formación de agregados en presencia de estos ligandos (imágenes no mostradas), en una situación muy similar a la que se había visto con el ligando VS2.18.



**Figura 36. Efecto de agregación de BsFtsZ por los ligandos VS2.25, VS2.33, VS2.36, VS2.48.** Se muestra el gel PAGE-SDS con las muestras resultantes de la sedimentación de BsFtsZ (10  $\mu$ M) en ausencia de nucleótido y en presencia de los compuestos a tres concentraciones: 50, 100 y 200  $\mu$ M. Como controles se muestra la proteína con 1mM de GTP, 1mM de GDP y en ausencia de nucleótido. Los ensayos se realizaron en tampón Hepes, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 % de DMSO. Se muestran los porcentajes de proteína detectada en el sedimento en relación a la proteína total en cada uno de los carriles.

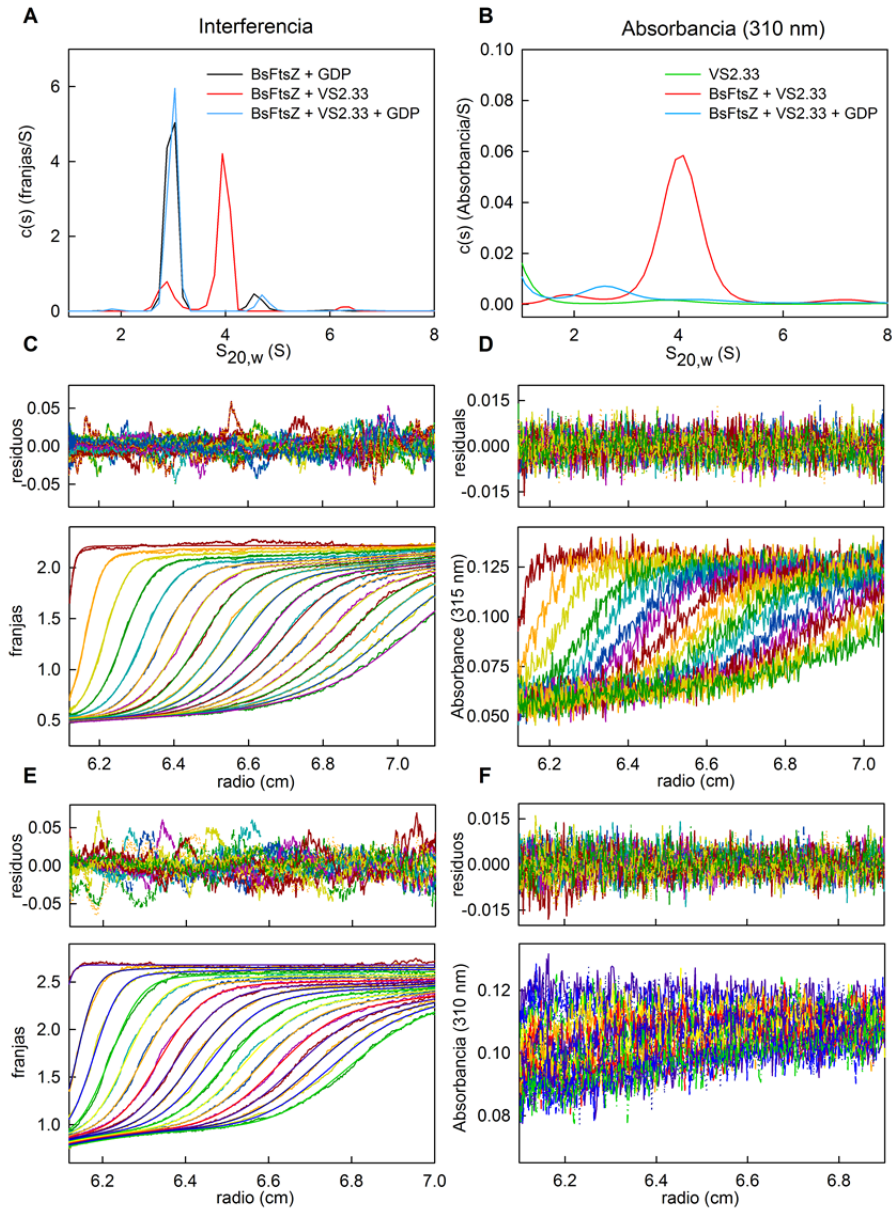
#### IV.2.1 Ensayos de unión directa de VS2.33 a BsFtsZ

Se estudió la unión del compuesto VS2.33 a FtsZ mediante sedimentación por ultracentrifugación analítica (**Figura 37**). La unión de VS2.33 (30  $\mu$ M) a BsFtsZ (15  $\mu$ M) se confirmó en este ensayo, donde se observa el complejo proteína – ligando formando una

población mayoritaria que sedimenta a una velocidad de  $s_{20,w} = 4.05$  S. En presencia de GDP o con GDP y VS2.33, en cambio, lo hace a  $s_{20,w} = 3.0$  S, aunque hay que tener en cuenta que se sigue observando una población minoritaria en presencia del ligando y proteína que sedimenta a  $s_{20,w} = 2.9$  S. Estos resultados se pueden explicar con una población monomérica, en los casos en los que hay presencia de GDP y de GDP con VS2.33, y una población oligomérica, en presencia únicamente del ligando.

En la muestra en la que no hay proteína, no se detecta sedimentación del compuesto (canal de absorbancia a 305 nm). Sucede lo mismo en presencia de GDP, dado que desplaza al ligando y éste no sedimenta al tratarse de moléculas pequeñas que no forman complejo con la proteína, por lo que no aparece monitorizado. En ausencia de GDP y en presencia de VS2.33, la proteína forma oligómeros que sedimentan a la misma velocidad a la que se detecta la absorción del compuesto, en esa misma muestra, en el canal de absorbancia a 305 nm. A partir del área de los picos y las concentraciones iniciales, se calculó que la relación de unión de moléculas de ligando por moléculas de proteína está alrededor de 0.9.





**Figura 37. Unión de VS2.33 a BsFtsZ determinado mediante un ensayo de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica.** **A.** Distribución de los coeficientes de sedimentación de la proteína  $c(s)$ , medido con la óptica de interferencia, de 15  $\mu\text{M}$  de BsFtsZ en presencia de 100  $\mu\text{M}$  de GDP (línea negra), en presencia de 30  $\mu\text{M}$  de VS2.33 (línea roja), y en presencia de ambos, GDP y VS2.33, 100  $\mu\text{M}$  y 30  $\mu\text{M}$ , respectivamente, (línea azul). **B.** Distribución de los coeficientes de sedimentación del ligando medidos por absorbancia radial a 310 nm del compuesto solo (línea verde), en presencia de BsFtsZ (línea roja) y con BsFtsZ y GDP (línea azul). **C.** Barridos radiales sucesivos de interferencia de la distribución de BsFtsZ durante el experimento en presencia del ligando VS2.33. **D.** Barridos de la absorbancia radial a 310 nm que permiten seguir la co-sedimentación del ligando en el mismo experimento que en **C**. **E** y **F** son las mismas medidas que **C** y **D** (respectivamente) pero en este caso con las muestras que además llevan GDP. En **F** se observa que el ligando no sedimenta con la proteína por acción del GDP. Se muestran también los residuos de los ajustes. Todos los ensayos han sido realizados en tampón Hepes (pH 6.8), 10 mM  $\text{MgCl}_2$  y 2 % de DMSO, a 25  $^{\circ}\text{C}$ .

#### IV.2.2 Cristalografía del complejo proteína-ligando (BsFtsZ-VS2.33)

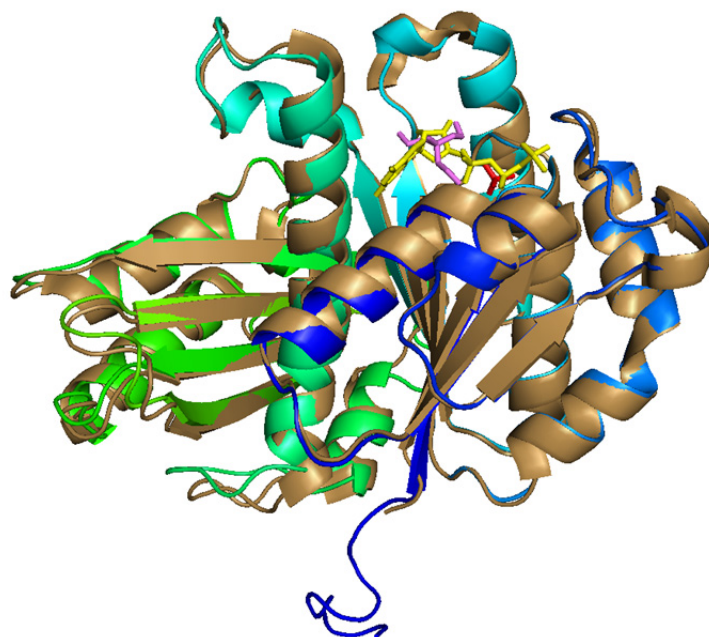
Las pruebas de cristalización de la proteína BsFtsZ sin inhibidor fueron exitosas, pues se obtuvieron cristales con una reproducibilidad y velocidad de crecimiento relativamente sencillas: en tan sólo 24 horas después de la preparación de las gotas (en el mismo tampón de purificación: tampón C). La condición inicial que más favoreció la obtención de cristales de buen tamaño y con un crecimiento adecuado fue 30 - 55 % PEG200, 0.1 M BIS-TRIS (pH 8.0) y 50 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , incubando a 14 ó 20 °C. Los cristales con proteína sin ligando no se llevaron a difractar, pero sirvieron para establecer las condiciones iniciales para tratar de cristalizar la proteína en presencia de los ligandos. Se repitió el ensayo, esta vez con los ligandos VS2.25, VS2.33, VS2.36, VS2.48, VS2.54, VS2.58 y VS2.62, en presencia de la proteína. El éxito para la obtención de cristales fue el mismo; con el compuesto VS2.33 se obtuvieron los cristales más homogéneos pero todos ellos se llevaron a difractar. En la **Figura 38** se muestran algunos de los cristales obtenidos en presencia de VS2.33, ligando con el que también se obtuvieron los mejores datos de difracción por rayos-X.



**Figura 38. Cristales de BsFtsZ en presencia de VS2.33.** Imágenes de los cristales obtenidos tras la co-cristalización de BsFtsZ (2mg/mL) en presencia de 200  $\mu\text{M}$  de VS2.33, a unas condiciones de cristalización de: 30 - 55 % PEG200, 0.1 M BIS-TRIS (pH 8.0) y 50 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ , incubando a 20 °C.

La primera estructura que se resolvió de BsFtsZ en co-cristalización con 200  $\mu\text{M}$  de VSA2.33, mostró una densidad en el sitio de unión de GTP que, debido a su pequeño tamaño no podía explicarse con el nucleótido ni con los ligandos empleados en la co-cristalización. La hipótesis inicial fue que la molécula debía ser algún componente empleado en las condiciones de cristalización de la muestra (30 - 55 % PEG200, 0.1 M BIS-TRIS (pH 8.0) y 50 mM  $\text{Li}_2\text{SO}_4$ ). Se pensó en el  $(\text{SO}_4)^{2-}$  procedente de  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  usado como aditivo en la cristalización. Por ello se eliminó de las condiciones empleadas el

$\text{Li}_2\text{SO}_4$ . Afortunadamente, se consiguieron obtener cristales sin emplear este aditivo. No obstante, la segunda vez que se recogieron datos con los cristales obtenidos en estas nuevas condiciones (30 - 55 % PEG200, 0.1 M BIS-TRIS, pH 8.0), volvió a detectarse la misma densidad en el bolsillo de unión del nucleótido de BsFtsZ. La explicación más plausible a este hecho señaló al sulfato de amonio empleado en la purificación de la proteína como elemento residual presente en la muestra. Este sulfato se posiciona en el bolsillo catalítico, en la región en la que el fosfato  $\beta$  del GTP quedaría posicionado, según muestra la estructura resuelta (**Figura 39**). El cristal mostró un empaquetamiento cristalino con un grupo espacial de tipo  $\text{P2}_1\text{2}_1\text{2}_1$ . En la resolución de la estructura se observó que el BIS-TRIS, empleado en las condiciones de cristalización, aparecía también unido al sitio de GTP, en una región que solapa con la ribosa del GTP en la estructura de referencia. La estructura resuelta sin ligando, permitió resolver una parte de la cadena peptídica de BsFtsZ que no se había resuelto hasta la fecha. Esta región se corresponde con los 11 primeros aminoácidos del extremo amino terminal.



**Figura 39. Modelos superpuestos de la estructura cristalográfica obtenida por rayos-X y la estructura 2RHO.** La nueva estructura (pendiente de depositar en el PDB) muestra la región del extremo N-terminal desestructurado (11 aminoácidos, color azul), no resuelto hasta la fecha. En el sitio catalítico hay un sulfato (color rojo) y BIS-TRIS (color violeta), y ambos solapan con el GTP (color amarillo) del modelo 2RHO (color marrón). El refinamiento de los datos para resolver la estructura (**Tabla 4**) se muestra en el apartado **III.6.1.4 de Materiales y Métodos**.

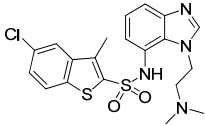
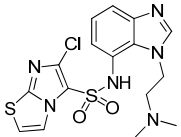
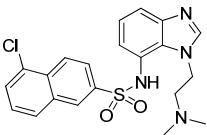
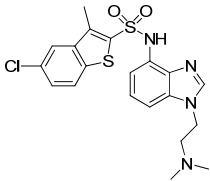
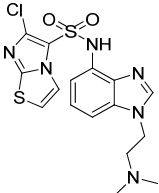
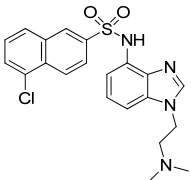
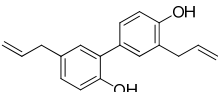
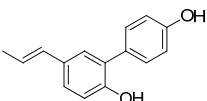
### IV.3 Otros compuestos de la quimioteca UCM y de la literatura

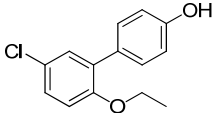
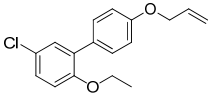
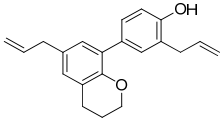
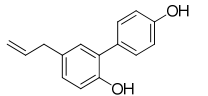
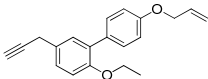
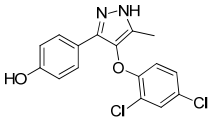
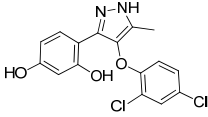
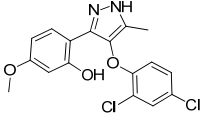
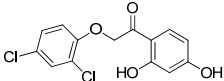
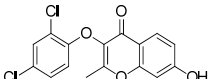
Para aumentar variabilidad química y buscar otros compuestos que se unieran al sitio del nucleótido en FtsZ, se realizó una búsqueda en la quimioteca del laboratorio de Química Médica II de la UCM, compuestos con estructura química similar a nuestros compuestos VS2 y a otros compuestos descritos en la literatura como inhibidores de FtsZ. Se seleccionaron los siguientes compuestos (**Tabla 13**):

1. Derivados de benzimidazol (UCM-105 a UCM-110), Se ha descrito que algunos derivados de benzimidazol, piridopirazinas y pteridinas, presentan una potente actividad antibacteriana en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (Reynolds *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2010; Awasthi *et al.*, 2013; Knudson *et al.*, 2014). Se cree que estos compuestos interfieren en el proceso de división celular de *M. tuberculosis*, aunque se desconoce si su mecanismo de acción se debe a la unión a FtsZ. Sólo mediante cribados virtuales se ha hipotetizado que algunos de estos compuestos podrían unirse al sitio de GTP en MtFtsZ, la FtsZ de *M. tuberculosis* (Awasthi *et al.*, 2013; Knudson *et al.*, 2014).
2. Honokiol (UCM111). Se ha descrito que este ligando inhibe la polimerización de FtsZ y presenta actividad antibacteriana en cepas de *S. aureus* multiresistente (MDR) y resistente a meticilina (MRSA) (Liu *et al.*, 2014). Junto con este ligando, se ensayaron otros compuestos sintéticos derivados de Honokiol (UCM112 a UCM117), que han sido incluidos en este grupo.
3. UCM124 a UCM 128 son compuestos con estructura química relacionada con los VS2, es decir, tienen anillos de benceno con Cl y OH como sustituyentes, la diferencia es que les falta el anillo central heterocíclico de 5 eslabones alrededor del cual se disponen los 2 bencenos.

Igual que se ha hecho con todos los compuestos presentados en esta Tesis, se comprobó si se unían al sitio del nucleótido en FtsZ mediante el ensayo de desplazamiento de *mant*-GTP y se midió la actividad antibacteriana en células de *B subtilis* 168 (**Tabla 13**).

Tabla 13. Afinidad a BsFtsZ y actividad antibacteriana de otros compuestos provenientes de la quimioteca de la UCM.

Nombre	Estructura	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	MICs ( $\mu\text{M}$ ) ( <i>B.sub</i> 168)
UCM105 (GL-01)		$57 \pm 2$	>200
UCM106 (GL-02)		No desplaza	>100
UCM107 (GL-03)		$53 \pm 3$	>200
UCM-108 (GL-05)		$92 \pm 9$	100
UCM-109 (GL-06)		$\sim 93$	>200
UCM-110 (GL-07)		$\sim 120$	>200
UCM-111 (Honokiol)		$18 \pm 2$	100
UCM-112 (AZ523A)	 AZ523A	$34 \pm 2$	100

UCM-113 (AZ531B)	 AZ531B	$26 \pm 2$	100
UCM-114 (AZ452)		No desplaza	No medido
UCM-115 (AZ539C)		No desplaza	No medido
UCM-116 (AZ540)		$\sim 20$	50
UCM-117 (HA73C)		No desplaza	No medido
UCM-124 (RM-010)		$3.1 \pm 0.3$	20
UCM-125 (ZD-587)		$4.3 \pm 0.2$	40
UCM-126 (ZD-588)		$7.3 \pm 1$	20
UCM-127 (LR-028)		$33 \pm 1.1$	75
UCM-128 (LR-030)		(No se puede medir con el <i>mant</i> -GTP): Abs $\sim$ 375nm /Emis. $\sim$ 470nm	>100

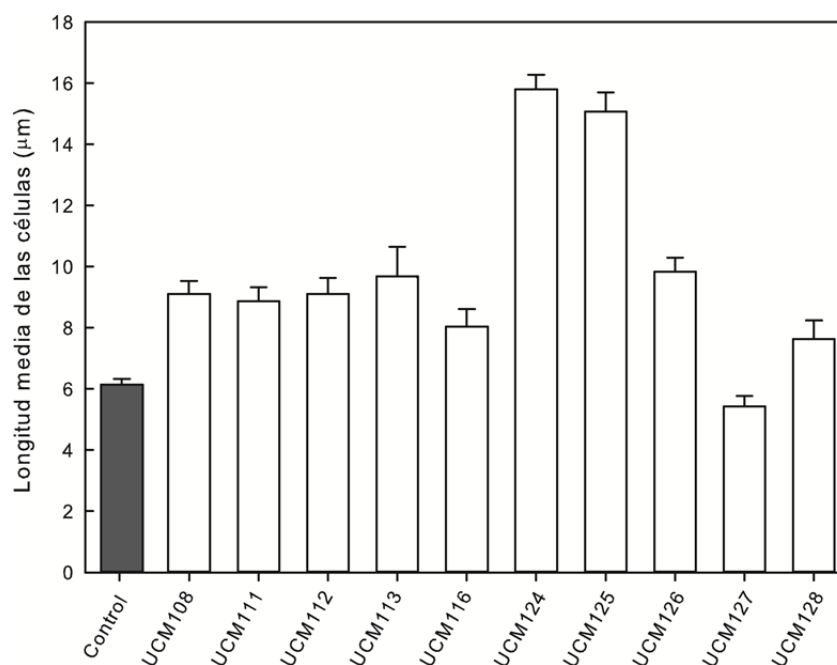
Se ha visto que los compuestos que compiten con el *mant*-GTP por el sitio de unión de nucleótido en BsFtsZ son los ligandos UCM105, UCM107, UCM108, UCM109, UCM110, UCM111, UCM112, UCM113, UCM116, UCM124, UCM125, UCM126 y UCM127; y de todos ellos, los que presentan mayor afinidad por el sitio de unión son los ligandos que provienen de modificaciones de los compuestos VS2 (UCM124, UCM125 y UCM126), del proyecto anterior. Estos ligandos se unen con una afinidad ( $K_d$ ) de  $3.1 \pm 0.3 \mu\text{M}$  (UCM124),  $4.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$  (UCM125) y  $7.3 \pm 1 \mu\text{M}$  (UCM126), y además son los que mejores valores de MIC (en *B. subtilis* 168) presentaron:  $20 \mu\text{M}$ ,  $40 \mu\text{M}$  y  $20 \mu\text{M}$ , para UCM124, UCM125 y UCM126, respectivamente.

El Honokiol ha sido descrito en la literatura, además de cómo inhibidor de FtsZ, como profármaco con potencial anti-inflamatorio, anti-angiogénico, anti-oxidativo y con propiedades anticancerígenas *in vitro* y en modelos preclínicos (Arora *et al.*, 2012). Se ha determinado experimentalmente que este ligando (Honokiol o UCM111 en nuestros ensayos) es capaz de desplazar al ligando natural de su sitio de unión en BsFtsZ con una  $K_d = 18 \pm 2 \mu\text{M}$ . De todos los derivados de este compuesto sólo UCM112, UCM113 y UCM116 mostraron afinidad de unión por el sitio del GTP en BsFtsZ. UCM116, mejora la actividad antibacteriana en *B. subtilis* 168 ( $50 \mu\text{M}$ ). UCM112 y UCM113 mantienen la misma actividad antibacteriana que Honokiol, y el resto no presentaron actividad antibacteriana en esta especie.

Los compuestos UCM124 a UCM126, con estructura similar a los ligandos más efectivos del proyecto de cribado virtual pero con un núcleo metilpirazol en lugar de una aminotiazol, se unen al sitio del GTP en BsFtsZ con una afinidad similar a los mejores VS2 ( $K_d = 3 - 7 \mu\text{M}$ ). No obstante, la afinidad de estos compuestos es menor a la que se determinó con los derivados con el núcleo de bifenilo (UCM81,  $K_d = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) y presentan una menor actividad antibacteriana frente a *B. subtilis* 168 ( $20 \mu\text{M}$  con UCM124 y UCM126;  $40 \mu\text{M}$  con UCM125).

Se estudió el efecto en la morfología de *B. subtilis* 168 de aquellos compuestos que presentaban unión al sitio del GTP en BsFtsZ y MIC, midiéndose la longitud media de las células en presencia de dichos compuestos (**Figura 40**). Los resultados mostraron que, salvo los compuestos UCM124 a  $10 \mu\text{M}$  y UCM125 a  $20 \mu\text{M}$ , el resto no producen una elongación de las células bacilares. No obstante, ni UCM124 ni UCM125 producen un aumento en la longitud celular que supere 3 veces la longitud de las células control, por lo que no podrían ser considerados inhibidores potenciales de FtsZ. En cualquier caso, se

estudió el efecto de éstos compuestos en la localización del anillo Z con la cepa de *B. subtilis* SU570, sin observarse formación de *foci* ni deslocalización de anillos Z con ninguno de ellos. En base a estos resultados, estos ligandos no se han considerado inhibidores específicos de FtsZ, y no se prosiguió con su estudio.



**Figura 40. Medidas de la longitud de las células de *B. subtilis* 168 en presencia de los compuestos.** Las células de *B. subtilis* 168 se incubaron durante 3 horas con los ligandos UCM108 (50 μM), UCM111 (50 μM), UCM112 (50 μM), UCM113 (10 μM), UCM116 (25 μM), UCM124 (10 μM), UCM125 (20 μM), UCM126 (10 μM), UCM127 (20 μM) y UCM128 (10 μM).

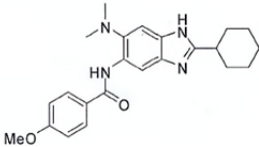
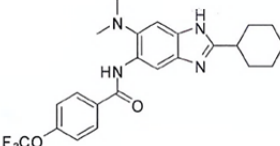
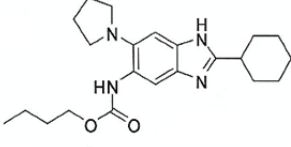
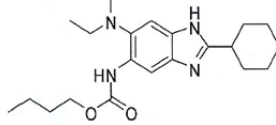
Durante el presente trabajo, se han probado también compuestos descritos como inhibidores de FtsZ pero cuyo sitio de unión en la proteína se desconocía. Entre estos compuestos se encuentran los profármacos antituberculosos, cedidos por el Dr. Iwao Ojima (compuestos SB- en la **Tabla 14**), basados en la estructura del paclitaxel (inhibidor de tubulina) y derivados de benzamidazol (Awasthi *et al.*, 2013; Knudson *et al.*, 2014), y los compuestos cedidos por el Dr. Kuldipsinh P. Barot (compuestos KPB- en la **Tabla 14**) (Barot *et al.*, 2014). A pesar de que se ha descrito que algunos de estos compuestos inhiben la actividad GTPasa de la FtsZ de *M. tuberculosis* (MtbFtsZ) (Awasthi *et al.*, 2013; Knudson *et al.*, 2014), en los ensayos realizados se ha visto que algunos de estos compuestos probados (compuestos SB-) no desplazan la sonda del sitio de unión del GTP en BsFtsZ, y no muestran actividad antibacteriana en *B. subtilis* 168 hasta la máxima concentración probada (400 μM). Una posible explicación sería que estos compuestos sólo fueran



efectivos en MtbFtsZ. Además hemos determinado que ninguno de estos ligandos modifica el ensamblaje de BsFtsZ en ensayos de polimerización de la proteína en presencia de estos ligandos (resultados no mostrados).

**Tabla 14. Otros compuestos probados resultantes de colaboraciones con otros laboratorios.** Ninguno de ellos desplazaron el mant-GTP de su sitio de unión en FtsZ ni presentaron actividad antibacteriana en *B. subtilis* 168.

Nombre del compuesto	Solubilidad en tampón Hepes ( $\mu\text{M}$ )	Estructura
KPB-10 (7)	$\sim 100$	
KPB-13	$50 \sim 100$	
KPB-15	Insoluble	
KPB-20 (7)	$\geq 100$	
KPB-202	$\geq 100$	
KPB-207	$\geq 100$	
KPB-212	$\geq 100$	
KPB-13 S,S	$\geq 100$	
KPB-15 S,S	$\geq 100$	

SB-P17G-A16 ( <i>c-2</i> )	~20	
SB-P17G-A20 ( <i>7c-4</i> )	<20	
SB-P8B2 ( <i>2</i> )	<20	
SB-P3G2 ( <i>1</i> )	<20	



## V. DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

FtsZ es una proteína esencial para la división bacteriana y hasta la fecha sólo se conocen dos sitios de unión de pequeños ligandos que pueden ser explotados para el desarrollo de inhibidores de la actividad de esta proteína. Uno de ellos es el sitio de unión de su ligando natural, el GTP, y el otro es el sitio de unión del compuesto PC190723. En esta Tesis se ha abordado el estudio y caracterización de nuevos ligandos que compiten con el GTP por su sitio de unión en FtsZ. El hallazgo de estos nuevos inhibidores contribuye a expandir el número de miméticos de GTP conocidos y promueve tanto el diseño racional como el uso de programas de cribado virtual de compuestos para el desarrollo de agentes antibacterianos con nuevos modos de acción.

### **V.1 Ligandos polifenólicos con núcleo de bifenilo compiten por el sitio de unión del GTP en BsFtsZ y presentan actividad antibacteriana en múltiples cepas**

En la literatura se han descrito algunos compuestos polifenólicos como inhibidores de FtsZ, tales como la viriditoxina, zantrinas 1 y 4, totarol, curcumina, ácido caféico y ácido clorogénico. Para la mayoría de estos compuestos no se conoce su sitio de unión en FtsZ (Schaffner-Barbero *et al.*, 2012), y fueron descritos como inhibidores de FtsZ en base a la inhibición de la actividad GTPasa de la proteína. En nuestro laboratorio se comprobó experimentalmente que algunos compuestos (curcumina, ácido cafeico, ácido clorogénico) (Ruíz-Ávila *et al.*, 2013) no se unían al sitio del GTP en FtsZ, al contrario de lo que proponían algunos trabajos (Kaur *et al.*, 2010; Rai *et al.*, 2008; Hemaiswarya *et al.*, 2011) y a pesar de las buenas puntuaciones en las energías libres de unión por el sitio del GTP en BsFtsZ, obtenidas en una revisión de nuestro laboratorio (Schaffner-Barbero *et al.*, 2012). Existen, por lo tanto, casos de compuestos que se han descrito como inhibidores en base a los ensayos de su actividad GTPasa en FtsZ, y que posteriormente su validez como inhibidores de FtsZ ha sido refutada, por tratarse de falsos positivos con resultados no reproducibles (Hurley *et al.*, 2016). Además, a pesar de que una inhibición de la actividad GTPasa es un indicador de la unión del compuesto a la proteína, esto no demuestra que el compuesto se esté uniendo al sitio de GTP, como ocurre con el compuesto PC190723, que

reduce la actividad GTPasa y se une a otro sitio en FtsZ distinto del sitio de unión del nucleótido. Es por ello que en este trabajo de Tesis doctoral se ha descartado emplear ensayos de inhibición de la actividad GTPasa.

En nuestro laboratorio, se consiguieron identificar mediante el ensayo de desplazamiento de la sonda *mant*-GTP del sitio de unión de GTP en BsFtsZ, compuestos polifenólicos provenientes de un cribado virtual de pequeñas moléculas sintéticas de la quimioteca interna del laboratorio UCM que se unen al sitio del nucleótido de BsFtsZ. Estos compuestos son derivados del (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), la principal catequina polifenólica del té verde (Cabrera *et al.*, 2003), con sustituciones del núcleo central de EGCG por un anillo de naftaleno (Puig *et al.*, 2008; Turrado *et al.*, 2012). A partir de este compuesto se sintetizaron nuevos compuestos que mejoraban la afinidad de unión por la diana. En este trabajo de Tesis se ha continuado con la optimización de estos ligandos, sustituyendo el núcleo de naftaleno por un núcleo de bifenilo, y estudiando cómo afectan las modificaciones del grupo espaciador y de los sustituyentes en los anillos externos a la afinidad por FtsZ y a su actividad antibacteriana.

En base a los resultados obtenidos con los ligandos UCM78, UCM79, UCM81, UCM83, UCM92 y UCM93, se ha determinado que, en general, la reducción en el número de hidroxilos en las posiciones R<sub>1</sub>-R<sub>6</sub> de los anillos de galato externos contribuye favorablemente a la inhibición del crecimiento en las especies bacterianas probadas, y no afecta negativamente a la afinidad por el sitio de unión en BsFtsZ, pues los valores de afinidad se mantienen en el orden submicromolar. Este hecho ya se intuía a partir de los resultados obtenidos con los compuestos de la anterior serie, con el naftaleno como núcleo central (Ruíz-Ávila *et al.*, 2013). Las posiciones que estos -OH ocupan en los anillos externos, no tienen un impacto significativo en los resultados de afinidad ni de actividad antibacteriana. También se ha visto que la eliminación del grupo éster como espaciador del núcleo de bifenilo con los anillos de galato externos (UCM96) no afecta negativamente a la afinidad por el sitio de unión de la proteína ( $K_d = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ) ni a la actividad antibacteriana en distintas cepas (5  $\mu\text{M}$  en *B. subtilis* 168 y 7  $\mu\text{M}$  en *S. aureus* MRSA), respecto a los compuestos con el grupo éster como espaciador (UCM81,  $K_d = 0.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ , MIC = 5  $\mu\text{M}$  en *B. subtilis* 168 y 7  $\mu\text{M}$  en *S. aureus* MRSA). No obstante, se ha determinado que la sustitución del grupo éster por grupos amida (UCM95, UCM97) o sulfonamida (UCM98) disminuyen significativamente las afinidades de unión, aunque se mantienen en el orden micromolar ( $K_d$  entre 4 y 8  $\mu\text{M}$ ). El grupo éster es fácilmente



hidrolizable, y su sustitución supone una ventaja, pues aumenta la estabilidad y por tanto el tiempo de vida medio de los inhibidores en el medio. Por otro lado, aquellos compuestos con un grupo éster a los que se les eliminó un anillo de galato (UCM80, UCM82, UCM92 y UCM94) presentaron una disminución significativa de la afinidad por el sitio de unión, aunque como en el caso anterior, la afinidad se mantiene en el orden micromolar.

A partir de los resultados obtenidos con estos compuestos en cuanto a actividad bacteriana en múltiples especies, se ha determinado que UCM78, UCM79, UCM81, UCM83 y UCM96 son los ligandos más efectivos de toda la serie. Estos compuestos inhiben el crecimiento de los patógenos Gram-positivos *L. Monocytogenes* y *S.aureus* MRSA a una concentración mínima inhibitoria entre 3 y 7  $\mu\text{M}$ . Este resultado se había visto con el compuesto UCM62 con núcleo de naftaleno. Los ligandos UCM64 (bifenilo parental), UCM82, UCM91, UCM92, UCM95, UCM97 y UCM98 también inhiben el crecimiento de ambas especies pero a una concentración mayor: 50  $\mu\text{M}$ . El compuesto UCM97, con espaciadores CONH de los anillos de galato con el núcleo central, es el único de toda la serie que produce un efecto antibacteriano (10  $\mu\text{M}$ ) en la cepa Gram-positiva de *E. faecalis*. Ninguno de los compuestos probados presentó actividad antibacteriana en cepas Gram-negativas, y se especula que esto puede ser debido a que no son capaces de atravesar la envoltura celular, que actúa de barrera para la entrada de moléculas pequeñas. Por otro lado, se ha determinado que estos compuestos no son inhibidores mitóticos, y sus valores GI50 en células humanas no se correlacionan con los resultados de inhibición *in vitro* del ensamblaje de tubulina (Artola *et al.*, 2015).

### **V.1.1 Los compuestos con núcleo de bifenilo producen filamentación de las células de *B. subtilis* y deslocalización del anillo Z**

En lo que respecta al efecto en células de *B. subtilis* tratadas con estos inhibidores, los resultados mostraron que la mayoría de estos compuestos afectan a la división celular y a la deslocalización del anillo Z, a las pocas horas de incubación. En presencia de estos inhibidores, se observa una elongación de las células, se reduce la aparición de anillos Z y se observa la deslocalización de FtsZ y la formación de *foci* a lo largo de las células. A pesar de que el ligando UCM96 tiene efecto en la inhibición de la división bacteriana, no mostró ningún efecto en la deslocalización del anillo Z, por lo que podría tratarse de un compuesto

con mecanismo de acción alternativo en la célula. Aunque un efecto multidiana es un inconveniente para el desarrollo de fármacos dirigidos a una diana específica, existen otros antibióticos en uso con un segundo mecanismo de acción (Silver *et al.*, 2011). Un ejemplo es la Kanamicina, antibiótico aminoglicosídico que afecta a la subunidad 30S de los ribosomas, provocando gran cantidad de errores de traducción, y a su vez modifica la permeabilidad de la membrana (Nonejuie *et al.*, 2013). En el trabajo de Araújo-Bazán *et al.*, 2016, se detalla cómo algunos de los antibióticos conocidos que no actúan en la división celular y tienen otras diana de acción en la célula como la pared celular (como la Vancomicina, Cefotaxima y Piperacilina), la membrana celular (como la Cerulenina y la Daptomicina), o la síntesis de proteínas (como la Kanamicina), producen también células elongadas incapaces de dividirse. Para distinguir entre compuestos que inhiben selectivamente el divisoma y otros que no lo hacen, se midió la longitud celular después del tratamiento con estos antibióticos en comparación con inhibidores de FtsZ descritos en la literatura, entre los que se encuentran hemi-crisofaentina, PC170942, MciZ, PC190723, DFMBa y algunos de los compuestos UCMs. Se vio que es necesario que las células midieran al menos, 3 veces la longitud del control para que los compuestos sean considerados inhibidores de FtsZ. En ese trabajo se identificó que de todos los compuestos probados, los ligandos UCM81, UCM93 y UCM95, son, junto con los compuestos hemi-crisofaentina, PC170942, MciZ, PC190723 y DFMBa, inhibidores selectivos del divisoma (Araújo-Bazán *et al.*, 2016).

De todos los compuestos de esta serie, UCM81 es el que, además de una elevada afinidad por el sitio del GTP en BsFtsZ y presentar actividad antibacteriana a concentraciones del orden submicromolar en múltiples cepas, produce el mayor efecto en la filamentación celular, dando lugar a células muy elongadas cuya longitud es 9 veces la de las células control (esta Tesis y Araújo-Bazán *et al.*, 2016). El efecto que UCM81 produce en la deslocalización del anillo Z y formación de *foci* a lo largo de la célula también es muy evidente a concentraciones muy por debajo de la MIC, y este efecto se confirmó mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos policlonales. En muchos casos la deslocalización de FtsZ y formación de *foci* coincide con la condensación anómala del nucleóide. A las pocas horas de incubación, los ligandos UCM78 y UCM79 lisan la membrana celular incluso a concentraciones por debajo de la MIC (3 y 5  $\mu$ M, respectivamente). Este resultado apuntaría a un segundo modo de acción de estos inhibidores en la membrana celular además de en FtsZ.

El efecto de UCM81 observado en células de *B. subtilis* 168 es similar al que se ha descrito con el compuesto PC190723, uno de los antibacterianos más efectivos en la inhibición de FtsZ y cuyo sitio de unión, tal y como se describe en la introducción de esta Tesis, se encuentra en una región distinta al sitio de unión del GTP, entre los dominios N y C-terminal de FtsZ, estabilizando la unión del GTP mediante un efecto alostérico. Sin embargo, en comparación con PC190723, el efecto de UCM81 en células es más moderado, y se pueden observar algunos anillos Z normales junto a *foci*.

### **V.1.2 UCM81, el ligando más efectivo de la serie, inhibe moderadamente el ensamblaje de los polímeros de FtsZ formando dímeros**

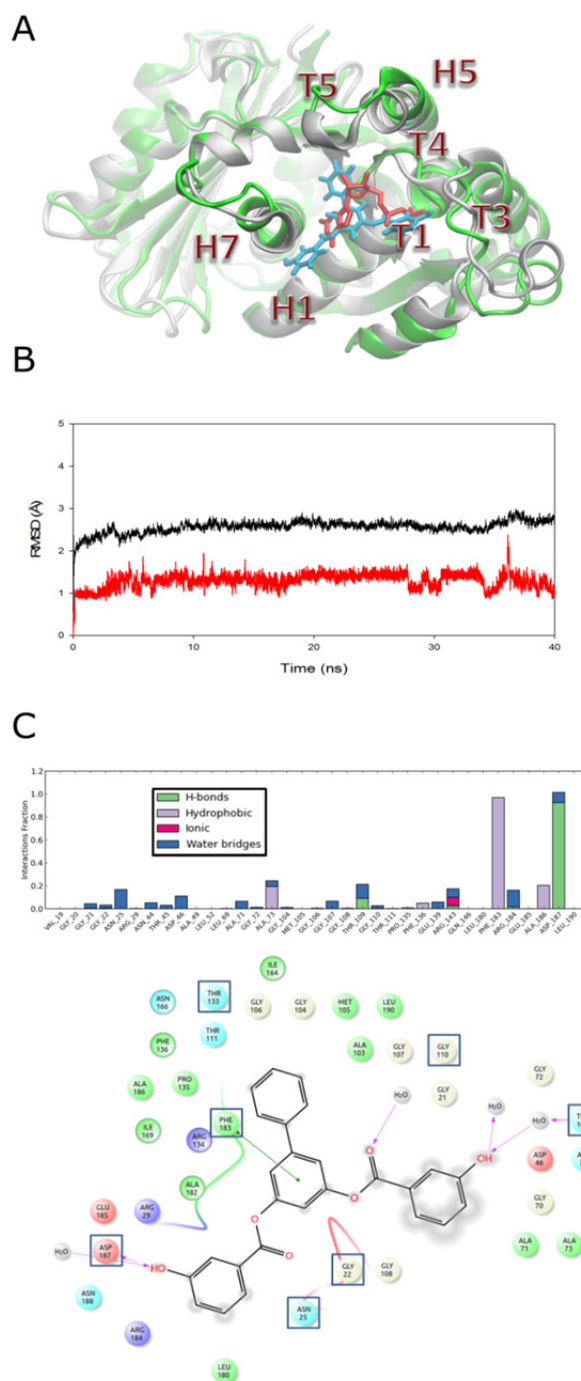
Se ha visto, con estos compuestos con el núcleo de bifenilo, que la inhibición de la polimerización *in vitro* no siempre correlaciona con la afinidad de unión y con la actividad antibacteriana. UCM81, pese a ser uno de los ligandos más afines y con la mejor actividad antibacteriana, produce un efecto moderado en la inhibición de la polimerización de BsFtsZ a las distintas concentraciones probadas (un 30 % tanto a 25  $\mu$ M como a 50  $\mu$ M), y no inhibe la polimerización de tubulina. UCM82, UCM97 y UCM98 inhiben, a una concentración de 25 - 50  $\mu$ M, alrededor de un 70 % la polimerización de BsFtsZ, respecto al control positivo con GTP, pero de estos tres compuestos, UCM82 y UCM98 inhiben a 100  $\mu$ M la formación de microtúbulos un 60 %. Los inhibidores de FtsZ que no inhiben tubulina (< 5%), son UCM64, UCM78, UCM79, UCM81, UCM91, UCM92 y UCM97. Los inhibidores de FtsZ que a su vez inhiben moderadamente el ensamblaje de tubulina (< 25 %) son UCM62, UCM93, UCM95 y UCM96. Los compuestos no selectivos (> 25 % de inhibición de la polimerización de tubulina) son: UCM82, UCM83 y UCM98. Esta inhibición no selectiva de FtsZ afectando la polimerización de tubulina, ya se vio con el ligando UCM05. El efecto en la inhibición de la polimerización de FtsZ también se estudió por microscopía electrónica con el ligando UCM81 y se vio una disminución en la cantidad de polímeros presentes en la muestra, reduciéndose también la formación de superestructuras de tipo toroide. Este efecto es similar al que se ha visto con el ligando parental UCM64. En base a los resultados obtenidos en la inhibición de la polimerización de BsFtsZ, creemos que estos compuestos al unirse al sitio de GTP podrían estar

distorsionando los contactos entre las subunidades de proteína en el filamento, impidiendo la auto-asociación entre monómeros necesaria para un correcto ensamblaje.

Mediante experimentos de velocidad de sedimentación por ultracentrifugación analítica se confirmó la unión directa del ligando UCM81 a FtsZ. Esto permitió, además, cuantificar la estequiometría de unión del compuesto UCM81 a la proteína que resultó ser 1:1 (Artola *et al.*, 2015). Se vio también que este ligando induce la dimerización de la proteína. Este hecho, junto con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición del ensamblaje de FtsZ en presencia de UCM81, indicaría que los dímeros de proteína que se forman con este ligando no serían funcionales para la polimerización de FtsZ.

### V.1.3 Modelo de unión de UCM81 a BsFtsZ determinado por dinámica molecular

Para entender cómo se posiciona y estabiliza el compuesto UCM81 en el sitio del GTP en BsFtsZ, se han analizado computacionalmente los modos de unión del complejo BsFtsZ – UCM81 mediante ajustes de acoplamiento y simulaciones de dinámica molecular. Este estudio fue realizado por Erney Ramírez-Aportela, del grupo de Bioinformática Estructural (IQFR-CSIC). Se usó el paquete bioinformático Maestro de Schrödinger, con el programa Glide, en su versión 6.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014 (Friesner *et al.*, 2006) para el acoplamiento molecular con el algoritmo de precisión extra y con OPLS-2005 como campo de fuerza (Jorgensen *et al.*, 1996; Kaminski *et al.*, 2001) y la estructura apo de FtsZ de *Bacillus subtilis* (PDB ID 2VXY) a 1.7 Å de resolución. Se observó que, tal y como pasaba con las simulaciones realizadas con los ligandos con el núcleo de naftaleno (Ruíz-Ávila *et al.*, 2013), el anillo central de bifenilo de los ligandos se une entre las hélices H7 y H5 y el bucle T5 en el bolsillo hidrofóbico del receptor, mientras que uno de los anillos hidroxibenzoil interactúa con los bucles T1 y T3, ricos en glicinas, y el otro es posicionado entre las hélices H1 y H7 (**Figura 41**).



**Figura 41. Modo de unión de UCM81 a BsFtsZ determinado por dinámica molecular (DM).** **A.** Imagen de DM del modo de unión del compuesto UCM8 (azul) a la proteína (verde) superpuesta con la estructura cristalográfica de FtsZ con GDP unido (gris). **B.** RMSD evaluado a lo largo de las trayectorias para FtsZ (línea negra) y el compuesto UCM81 (línea roja). Nótese que las simulaciones se mantienen a lo largo del tiempo en un estado estacionario, lo que sugiere la estabilidad del modelo de unión. **C.** Principales interacciones encontradas por fracción de tiempo total presente durante la simulación y su representación esquemática (Artola *et al.*, 2015).

Este posicionamiento se puede solapar con el que se observa con los azúcares, fosfatos y anillos de guanina del ligando natural, que se da en las estructuras cristalográficas BsFtsZ – GDP. Los residuos clave para la unión de UCM81 al bolsillo de la proteína, coinciden con los que estabilizan la unión con el ligando natural (GDP) determinados en anteriores dinámicas: El núcleo bifenilo se posiciona estableciendo una interacción  $\pi$ - $\pi$  con el anillo aromático del residuo Fenilalanina (F) – 183, mimetizando la unión que se establece con el eje de la guanina del nucleótido; el aminoácido Asparagina (N) – 187, con carga negativa, localizado entre H1 y H7, es también crucial para la interacción, mediante puentes de hidrógeno, con la cadena de hidroxilo de uno de los anillos hidroxibenzoil del UCM81; en lo que respecta al otro anillo, que cae en la región del bucle T3 de la proteína, se dan interacciones débiles con el aminoácido Treonina (T) – 109. En comparación con las simulaciones realizadas previamente con algunos de los compuestos de la serie con el núcleo de naftaleno (UCM05, UCM44 y UCM53), el núcleo de bifenilo aporta mayor volumen a la estructura y eso se traduce en una mayor exposición al solvente, aunque a pesar de este detalle, tanto los inhibidores con el núcleo de naftaleno como aquellos con el núcleo de bifenilo comparten el mismo mecanismo de interacción, desde el punto de vista del modelado.

Estos inhibidores, y en concreto UCM81, abren una nueva vía para el desarrollo y optimización de inhibidores dirigidos al sitio de unión del GTP en FtsZ, pues se ha demostrado que es posible mejorar tanto la selectividad como el efecto antibacteriano de los inhibidores parentales con los que se inició la búsqueda de ligandos.

## **V.2 Ligandos afines al sitio de GTP en BsFtsZ y con actividad antibacteriana, seleccionados a partir de un cribado virtual**

En este proyecto, se recurrió a métodos de cribado virtual para aportar mayor variabilidad química en la búsqueda de ligandos. Con el cribado virtual de más de 4 millones de compuestos con la plataforma ICM (Totrov y Abagyan, 1997) se ha conseguido obtener ligandos afines a la diana. Se seleccionaron 41 candidatos con las mejores puntuaciones teóricas de unión al sitio de GTP en BsFtsZ de los que sólo uno, el compuesto VS2.18, se une experimentalmente a BsFtsZ sin presentar actividad

antibacteriana. En otro cribado virtual se ha predicho que el compuesto VS2.18 se uniría a PIM-1, una serina-treonina quinasa que se expresa en células hematopoyéticas humanas y que ha sido descrita como un protooncógeno (Pierce *et al.*, 2008), que se sobreexpresa en gran cantidad de leucemias (Amson *et al.*, 1989). Se ha predicho que VS2.18 (compuesto 4 en Pierce *et al.*, 2008) se uniría a PIM-1 con una afinidad teórica de 3.4  $\mu\text{M}$  (Pierce *et al.*, 2008).

Mediante un cribado basado en la estructura química de este ligando, se obtuvieron 9 (de 10) compuestos similares que se unen al sitio del GTP en FtsZ, y que mejoran la afinidad de unión respecto al compuesto parental. Uno de ellos, el compuesto VS2.25, además, presentó efecto antibacteriano a 100  $\mu\text{M}$  en la cepa silvestre de *B. subtilis*. Este inhibidor era el único de toda la serie que no disponía de un grupo metoxilo en uno de los anillos externos de su estructura. Es por ello que en la segunda búsqueda de ligandos comerciales basada en la estructura de ambos *hits* (VS2.18 y VS2.25), se descartaron aquellos compuestos que tuvieran grupos metoxilo asociados a los anillos de benceno externos. Tras esta nueva selección, se compraron 32 compuestos, 31 de los cuales se unen con éxito al bolsillo catalítico de BsFtsZ manteniendo, en la mayoría de los casos, una afinidad similar a la del VS2.25 y mejorando la actividad antibacteriana en las distintas cepas probadas. Todos estos ligandos mantienen el aminotiazol como núcleo central (excepto VS2.59), y proponen distintas sustituciones en los anillos aromáticos externos, además de otras opciones, tales como la eliminación de éstos o su modificación asociándolos a otros grupos químicos no probados en el cribado inicial. Los ligandos que presentaron los mejores resultados de afinidad por el sitio de unión de GTP en BsFtsZ son: VS2.31, VS2.32, VS2.33, VS2.34, VS2.35, VS2.36, VS2.39, VS2.41, VS2.46, VS2.47, VS2.48, VS2.49, VS2.51, VS2.52, VS2.53, VS2.54, VS2.55, VS2.56, VS2.57, VS2.58, VS2.60, VS2.61 y VS2.62, con una  $K_d < 20 \mu\text{M}$ . Es importante señalar que la variabilidad química entre estos compuestos no ha evidenciado, en ningún caso, un cambio significativo en los resultados de afinidad de unión por el sitio del GTP en BsFtsZ ni tampoco en actividad antibacteriana. Esto ha dificultado la identificación de las modificaciones claves para mejorar afinidad/actividad. Sí se han encontrado modificaciones que no resultan favorables como son: la eliminación de todos los -OH sustituyentes de uno de los anillos (VS2.31, VS2.37 y VS2.41), la sustitución de uno de los anillos aromáticos por otros grupos químicos, como son piridinas (VS2.43 y VS2.45) o pirimidinas (VS2.44), la adición de una dioxina fusionada a uno de los anillos de benceno (VS2.51), la adición de dos grupos metoxilo (VS2.55) o un grupo dimetilamina (VS2.50) en uno de los bencenos, la presencia

de un grupo metilo como sustituyente en la amina que actúa como espaciador del núcleo central (VS2.57) y la eliminación de uno de los anillos externos y su sustitución por un ácido propanoico (VS2.42). También se ha podido comprobar que con el cambio del núcleo central por un metilimidazol se pierde tanto afinidad de unión como actividad antibacteriana. Como se vio en el caso de los ligandos UCMs, la disposición de los OH en los anillos no parece relevante en términos de afinidad por la diana ni en lo que respecta a la actividad antibacteriana.

Ninguno de estos compuestos mostró efecto antibacteriano en *E. coli* silvestre, pero sí que algunos de ellos inhiben el crecimiento de la cepa de *E. coli* con la membrana permeabilizada (EnvA1), por lo que su falta de actividad en la cepa silvestre se especula que se debe a problemas del ligando en atravesar la pared celular. Los compuestos con efecto antibacteriano en EnvA1, presentaron además efecto en *B. subtilis* 168 y en *S. aureus* (MRSA). Los ligandos que presentan las MIC más bajas ( $\leq 50 \mu\text{M}$ ) en las tres cepas (*B. subtilis* 168, *S. aureus* Mu50 y *E. coli* EnvA1) son: VS2.33, VS2.35 y VS2.48.

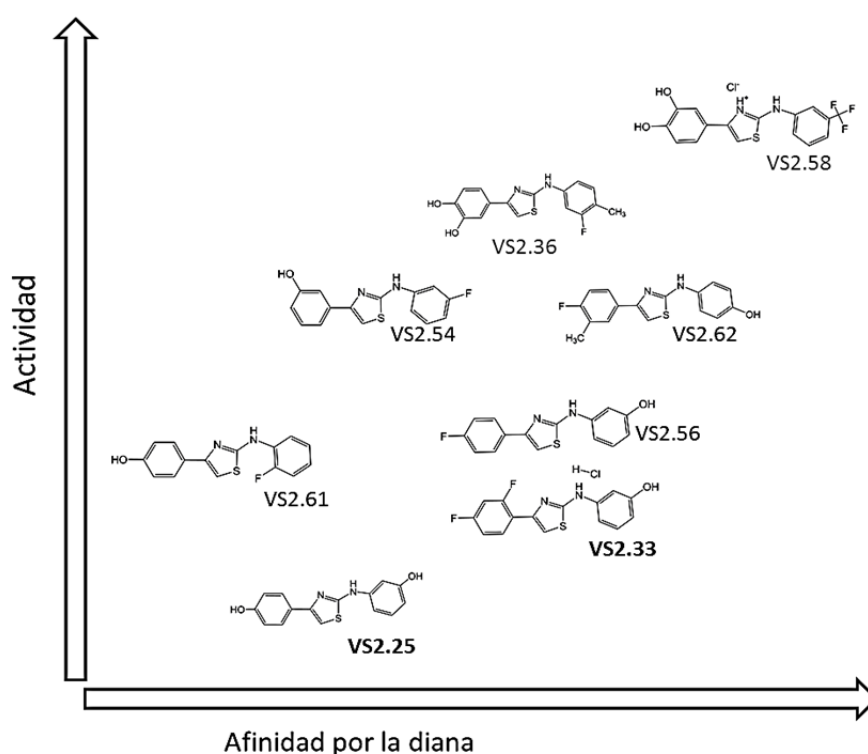
### **V.2.1 VS2.25, VS2.33, VS2.34, VS2.35, VS2.36, VS2.48 y VS2.58 inhiben la polimerización de BsFtsZ**

Los ligandos VS2.25, VS2.33, VS2.36, VS2.48 y VS2.58 en presencia de GTP y un sistema de regeneración de nucleótido, se comportan como inhibidores de la polimerización de BsFtsZ, reducen significativamente la dispersión de luz de los polímeros y disminuyen la fracción de polímero sedimentado. Además, mediante microscopía electrónica se ha visto que lo que se está inhibiendo, en presencia de estos compuestos, es la formación de superestructuras de tipo toroide, observándose un efecto más significativo con VS2.25 y VS2.33. El efecto observado de los ligandos a estudio pone de manifiesto que existe una alteración en la dinámica del ensamblaje de la proteína que impide la formación de polímeros ordenados. Igual que se observó con el compuesto UCM81, los resultados obtenidos por velocidad de sedimentación (AUC) de BsFtsZ en presencia de los ligandos VS2.25 y VS2.33 apuntan a la formación de un dímero que no sería funcional para la correcta polimerización de la proteína.



### V.2.2 Los ligandos VS2.25 y VS2.33 inhiben efectivamente la división celular de *B. subtilis*

La correlación entre la afinidad de unión y la MIC en distintas cepas bacterianas ha resultado, de nuevo, una estrategia útil para la identificación de los compuestos más prometedores de la serie. En la mayoría de los casos, el efecto de los compuestos en la elongación de las células también ha guardado relación con los compuestos más afines. No obstante hay algunas excepciones, pues cabe la posibilidad de que en células los ligandos se unan también a otras proteínas, o que produzcan un efecto lítico en la célula sin llegar a actuar en el divisoma. Por ejemplo, el compuesto VS2.35, pese a tratarse de uno de los mejores inhibidores de la serie, no afecta a la morfología de las células de *B. subtilis* 168 ni deslocaliza el anillo Z en *B. subtilis* SU570. En la **Figura 42** se representan los ligandos de la serie que producen un fenotipo en células característico de la inhibición de FtsZ. La característica común entre todos ellos es la presencia de grupos OH y/o átomos de F como sustituyentes en los anillos de benceno externos.

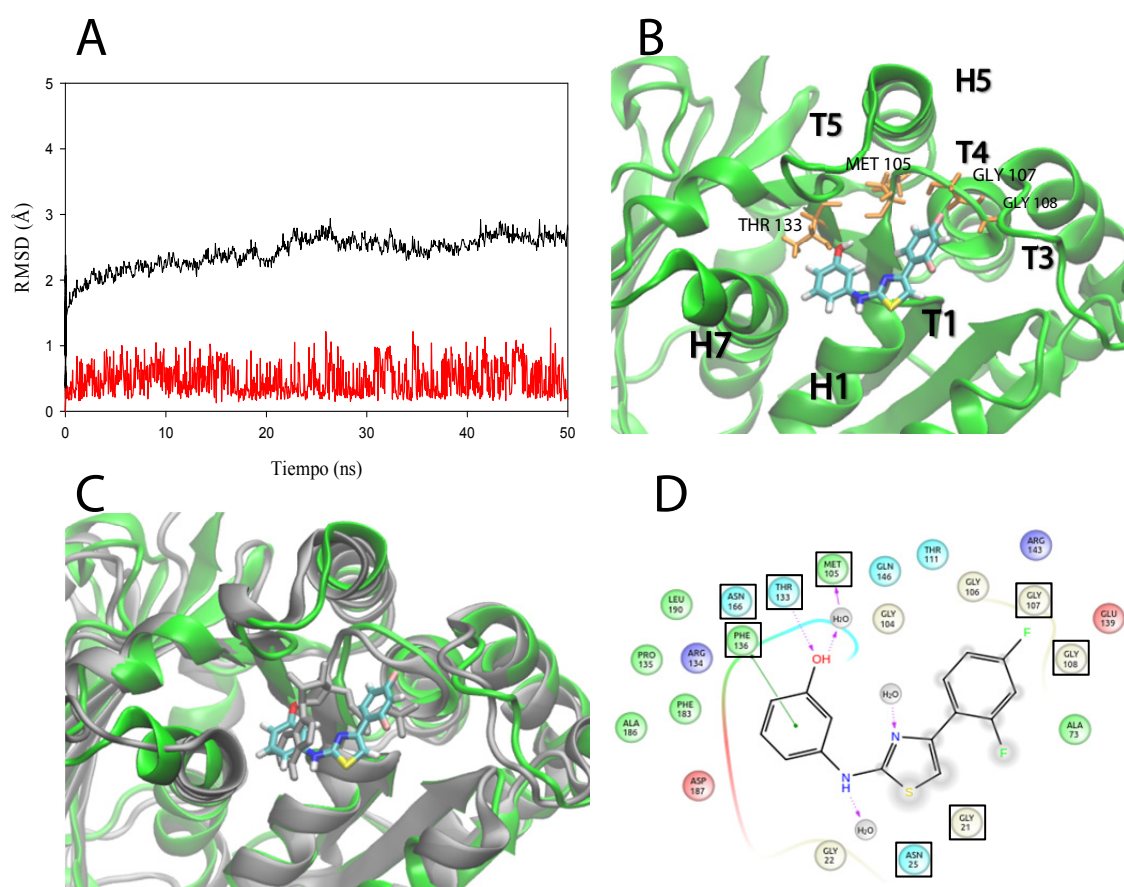


**Figura 42.** Esquema en el que se muestran los inhibidores que afectan el divisoma en *B. subtilis*. En negrita se han marcado los ligandos VS2.25 y VS2.33, por ser los que presentan un efecto más relevante en la elongación celular.

El ligando con mayor afinidad por FtsZ es VS2.58 que tiene un grupo trifluorometilbenceno. Este inhibidor induce la deslocalización de FtsZ en la célula pero no se ha observado filamentación celular, quizás debido a su actividad autolítica. VS2.25 y VS2.33 a pesar de no ser los inhibidores más afines a la diana ni los que presentan la mejor MIC de la serie, son los compuestos que presentan los resultados más potentes de inhibición funcional de FtsZ en *B. subtilis*, produciendo tanto la filamentación de las células (3 veces la longitud del control) como la deslocalización y distribución aberrante de los anillos Z, superando el criterio para ser considerados inhibidores específicos del divisoma, siguiendo la clasificación del perfil citológico propuesta en el trabajo de Araújo-Bazán *et al.*, 2016. Este resultado demuestra la importancia que tiene combinar ensayos bioquímicos con el estudio del perfil citológico para comprender mejor el mecanismo de acción de los compuestos en las células.

### **V.2.3 Modelo de la unión del ligando VS2.33 a BsFtsZ determinado por dinámica molecular**

Debido a la falta de una estructura cristalográfica del complejo BsFtsZ – VS2.33, se recurrió a técnicas de acoplamiento molecular y dinámica molecular (DM) que nos dieran pistas sobre el modo de unión. La dinámica molecular aporta información sobre los movimientos potenciales que puede adoptar el ligando en solución y en contacto con el sitio de unión de la proteína. Para el estudio de modelado, se eligió el compuesto VS2.33 por presentar efecto en células y buenos resultados de especificidad de unión a BsFtsZ y efecto antibacteriano en distintas especies. Estos experimentos se realizaron en colaboración con el Dr. Pablo Chacón, mediante el programa Glide (versión 6.3, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2014) (Friesner *et al.*, 2006) para el acoplamiento molecular, y con el programa Maestro de Schrödinger, versión 9.9.013 para la minimización de energías. El complejo VS2.33 – BsFtsZ con el valor de puntuación más elevado se sometió a una dinámica molecular de 50 ns con el programa Desmond (versión 3.8, D. E. Shaw Research, New York, NY, 2014) empleando como campo de fuerzas OPLS-2005 (Jorgensen *et al.*, 1996; Kaminski *et al.*, 2001).



**Figura 43. Modelo de unión del ligando VS2.33 en el sitio del nucleótido en BsFtsZ determinado por dinámica molecular.** **A.** Desviación cuadrática media (RMSD) durante 50 ns de simulación de la dinámica molecular de BsFtsZ (color negro) y con VS2.33 (color rojo). **B.** Modelo de unión de VS2.33 a FtsZ, extraída de la dinámica molecular del complejo mejor evaluado. **C.** Superposición de la estructura cristalográfica de la proteína con GDP (gris) con el modelo obtenido en **B**. **D.** Esquema de la interacción de VS2.33 con la proteína en el que se muestran los aminoácidos principales con los que se establece la unión.

La trayectoria de dinámica molecular de VS2.33 unido a BsFtsZ (**Figura 43**) muestra que el ligando se mantiene estable en el sitio durante todo el tiempo que dura la simulación y que no se observa una fluctuación dramática en estas condiciones (valor de fluctuación promedio por debajo de 1 Å). El anillo fenólico se posiciona en un extremo de la molécula anclado entre la hélice H7 y el bucle T5. El difluorobenceno se posiciona interaccionando con el bucle T4. Se ha identificado que sólo las regiones externas del ligando establecen las interacciones para estabilizar la molécula en el sitio de unión, por lo que el núcleo central (aminotiazol) no juega un papel clave la unión al bolsillo de unión de la proteína y queda

más expuesto al solvente. Si se compara la estructura cristalográfica del complejo BsFtsZ-GDP (PDB: 2RHL) con la unión que establecería VS2.33 con la proteína (**Figura 43C**) se observa que comparten regiones de interacción: el anillo fenólico del ligando se superpone con la guanina del GDP y el difluorobenceno lo hace con los fosfatos del nucleótido. El complejo queda estabilizado en esta región gracias al puente de hidrógeno que se forma con el grupo hidroxilo del anillo fenólico y los aminoácidos Metionina – 105 y Treonina – 133, y gracias a la interacción  $\pi$ - $\pi$  del propio benceno del ligando con el anillo aromático del aminoácido Fenilalanina – 136 (**Figura 43B y D**). En el difluorobenceno uno de los átomos de flúor establece una interacción con las Glicinas 107 y 108 del bucle T4.

## VI. CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

### **Respecto a los compuestos derivados de bifenilo:**

1. Los derivados de bifenilo se unen al sitio del GTP en BsFtsZ, y presentan actividad antibacteriana en el rango submicromolar. Estos ligandos son más afines al sitio de unión del nucleótido que los compuestos parentales con núcleo de naftaleno, y a la vez tienen un efecto mayor en la inhibición del crecimiento bacteriano.
2. UCM81 presenta actividad antibacteriana en *B. subtilis* y en cepas patógenas, como por ejemplo *S. aureus* MRSA.
3. El ligando UCM81 produce la filamentación de las células de *B. subtilis* 168, incapaces de dividirse, no produce alteraciones en la membrana celular, e induce la formación de *foci* a lo largo de las células de *B. subtilis* SU570. Por todo ello, UCM81 puede considerarse un inhibidor específico del divisoma.
4. Tanto UCM81 como UCM64, primer bifenilo de esta nueva serie, inhiben la polimerización de BsFtsZ en presencia de GTP, reduciendo la asociación de los filamentos *in vitro*.
5. UCM81 es un inductor de la oligomerización de FtsZ, y en solución forma de dímeros de proteína.
6. Mediante modelado molecular, se ha estudiado el modo de unión de UCM81 en el sitio del nucleótido en BsFtsZ, y se ha predicho que este ligando comparte regiones de interacción con el GDP en FtsZ.

**Respecto a los inhibidores seleccionados de quimiotecas de libre acceso mediante un cribado virtual frente a la estructura de BsFtsZ (2VXY):**

1. Se ha hallado una molécula (VS2.18) que se une al sitio de GTP en BsFtsZ, aunque sin actividad antibacteriana. Esta molécula es la primera, de entre un extenso programa de cribado virtual, en presentar afinidad experimental por la diana. A partir de un segundo cribado por homología química con VS2.18, se han hallado otros inhibidores que mejoran en afinidad por la diana y presentan actividad antibacteriana en múltiples especies.
2. Los ligandos VS2.25 y VS2.33 tienen un efecto significativo en la elongación de las células de *B. subtilis*, además de producir deslocalización de anillos Z. Ambos pueden considerarse inhibidores específicos del divisoma.
3. Los ligandos VS2.25, VS2.33, VS2.36 y VS2.48 inhiben la formación de polímeros de FtsZ *in vitro*, y disminuyen la presencia de superestructuras de tipo toroide y agregan la proteína en ausencia de GTP. VS2.18, VS2.25 y VS2.33, en solución, inducen la dimerización de la proteína.
4. Mediante modelado molecular, se ha estudiado el modo de unión de V2.33 en el sitio del nucleótido en BsFtsZ. Como en el caso de UCM81, este ligando comparte regiones de interacción con el GDP en FtsZ.

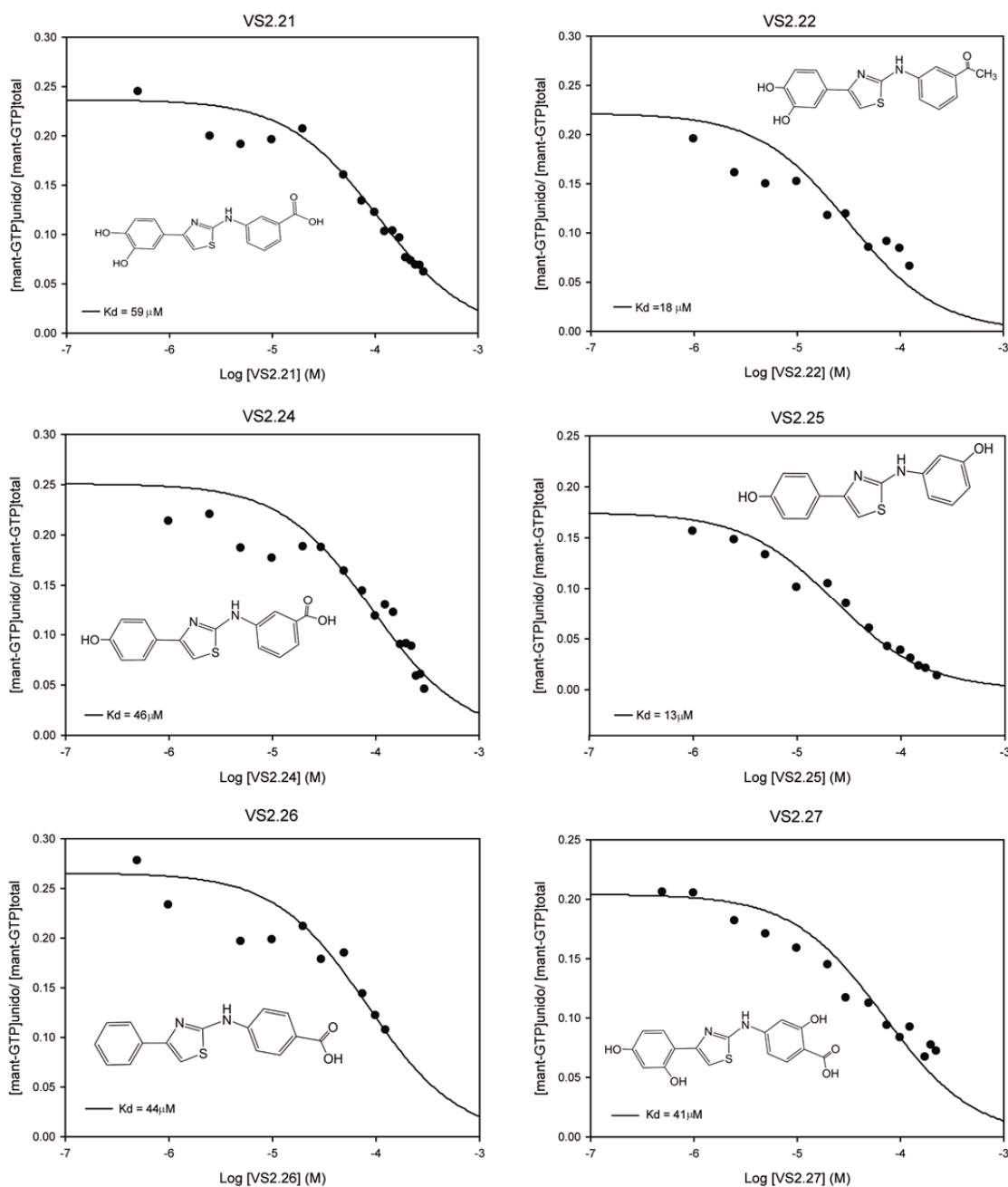


## VII. MATERIAL SUPLEMENTARIO



VII.1 Curvas de desplazamiento del *mant*-GTP

Se muestran los desplazamientos de la sonda *mant*-GTP del sitio de unión en BsFtsZ los compuestos VS2.21 – VS2.30:



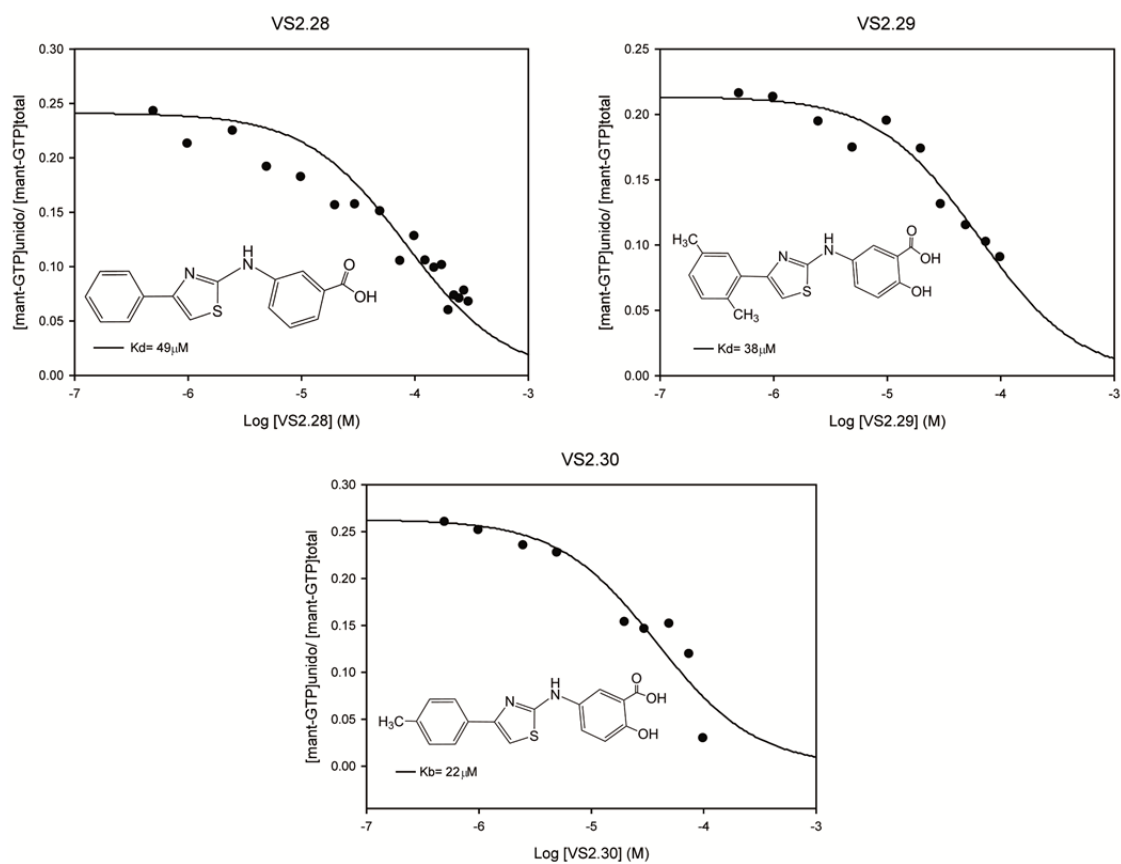
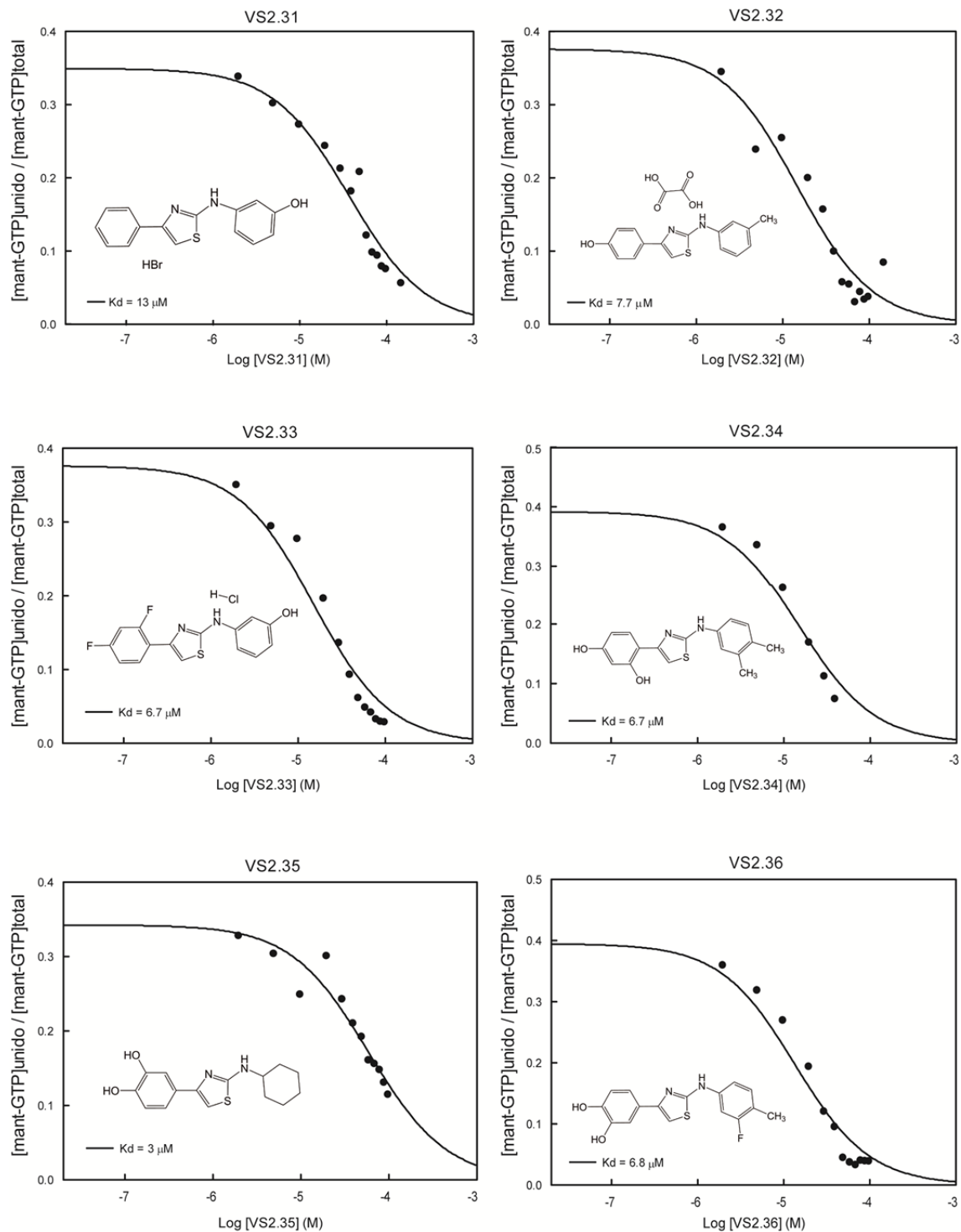
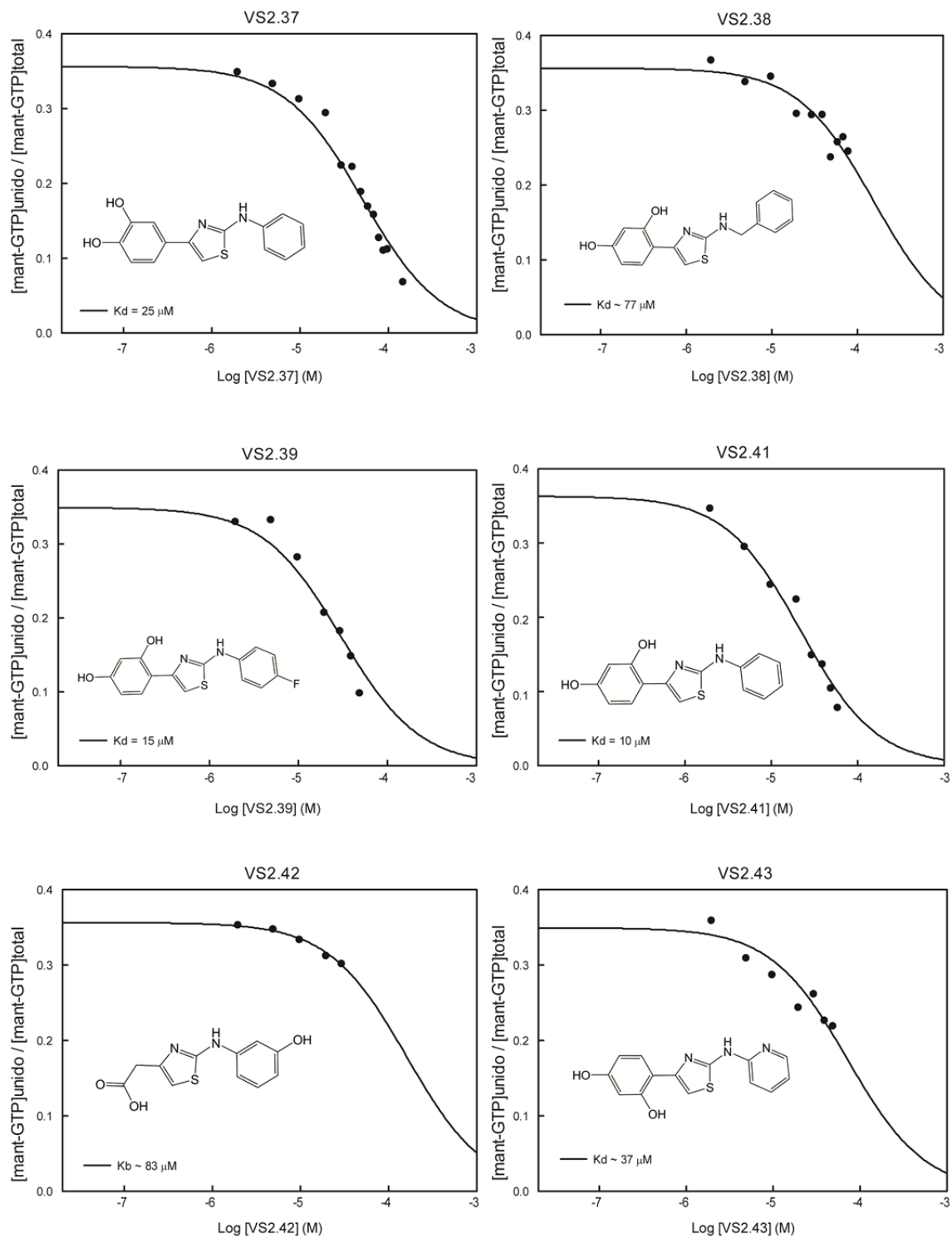
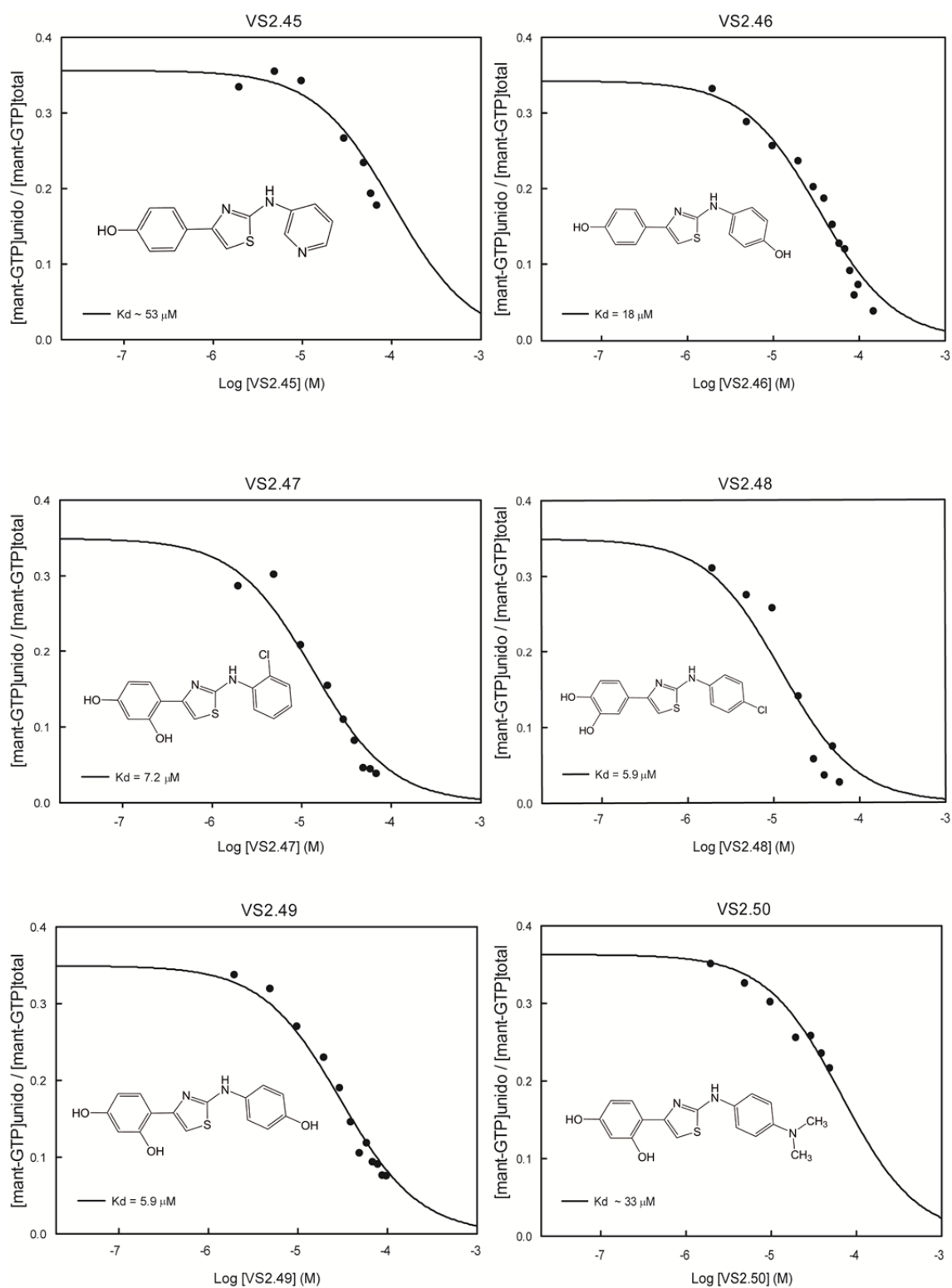


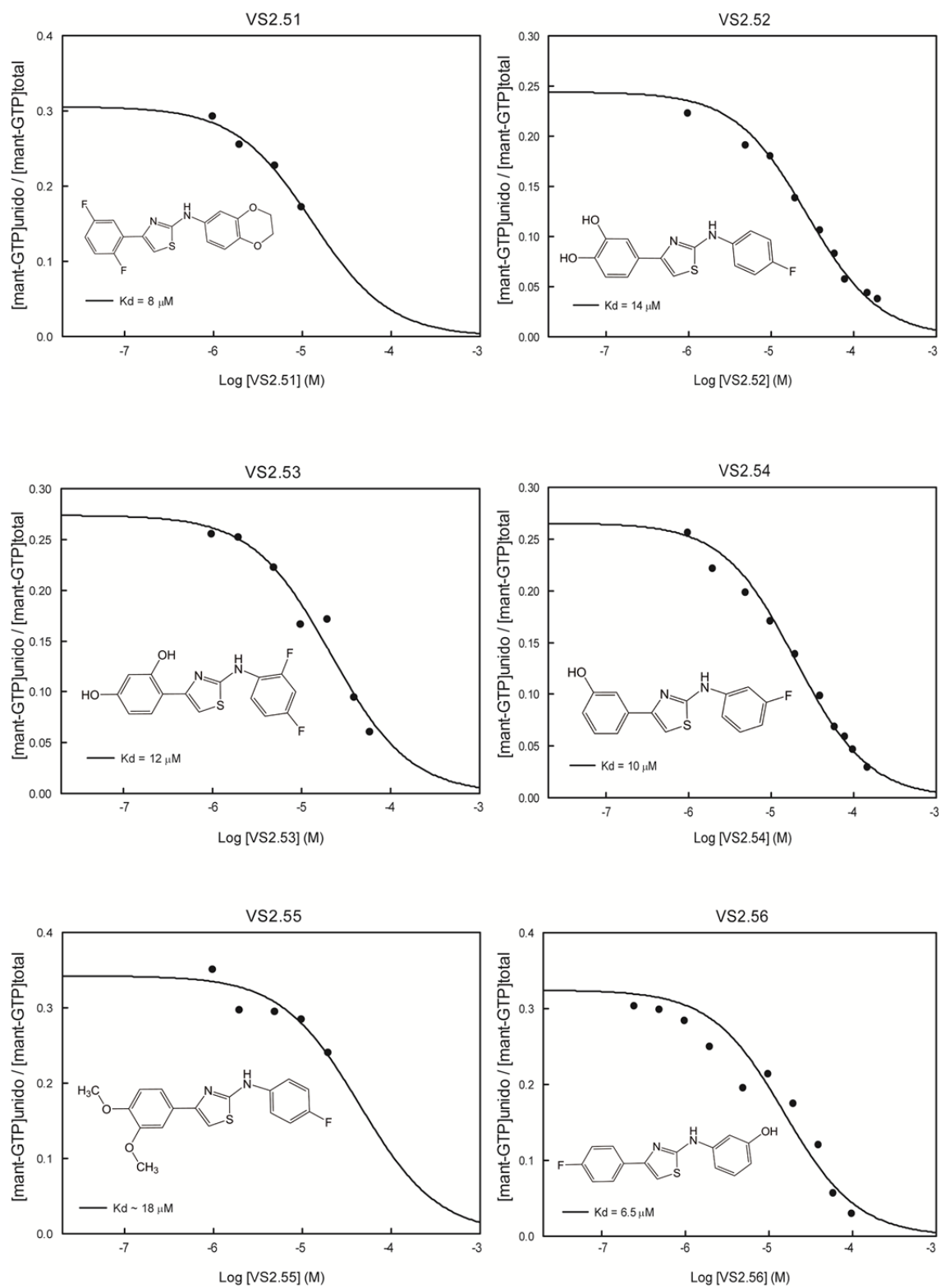
Figura 44. Curvas de desplazamiento del *mant*-GTP del sitio de unión del nucleótido en BsFtsZ por los ligandos obtenidos en el cribado virtual con estructura similar a VS2.18 (Serie VS2.21 – VS2.30). Ensayos realizados con 750 nM de BsFtsZ en tampón Hepes, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 nM de *mant*-GTP, 2% de DMSO y concentraciones crecientes de ligando.

Se muestran los desplazamientos de la sonda *mant*-GTP del sitio de unión en BsFtsZ los compuestos VS2.31 – VS2.62 (compuestos seleccionados en base a un cribado por homología con el ligando VS2.25):

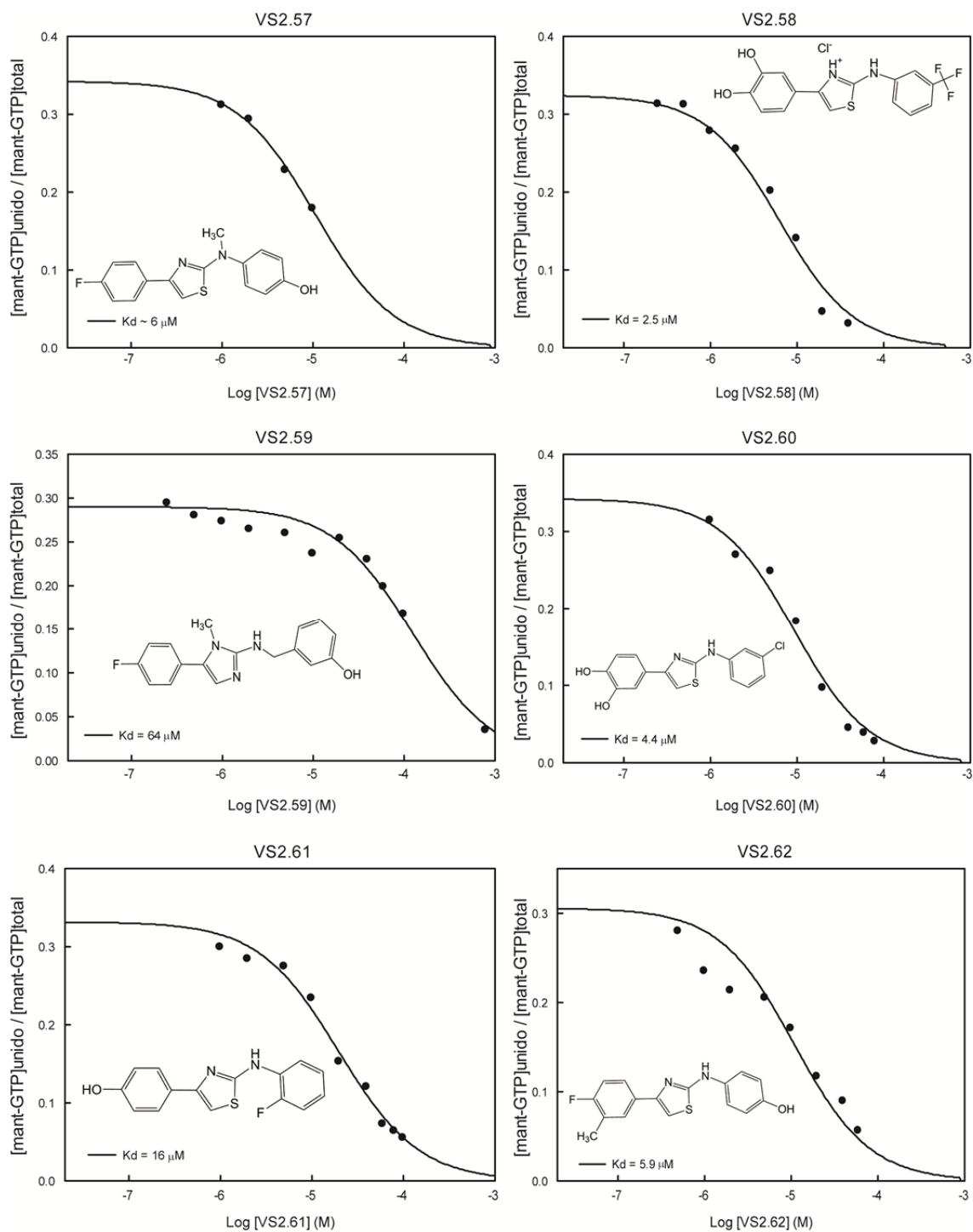








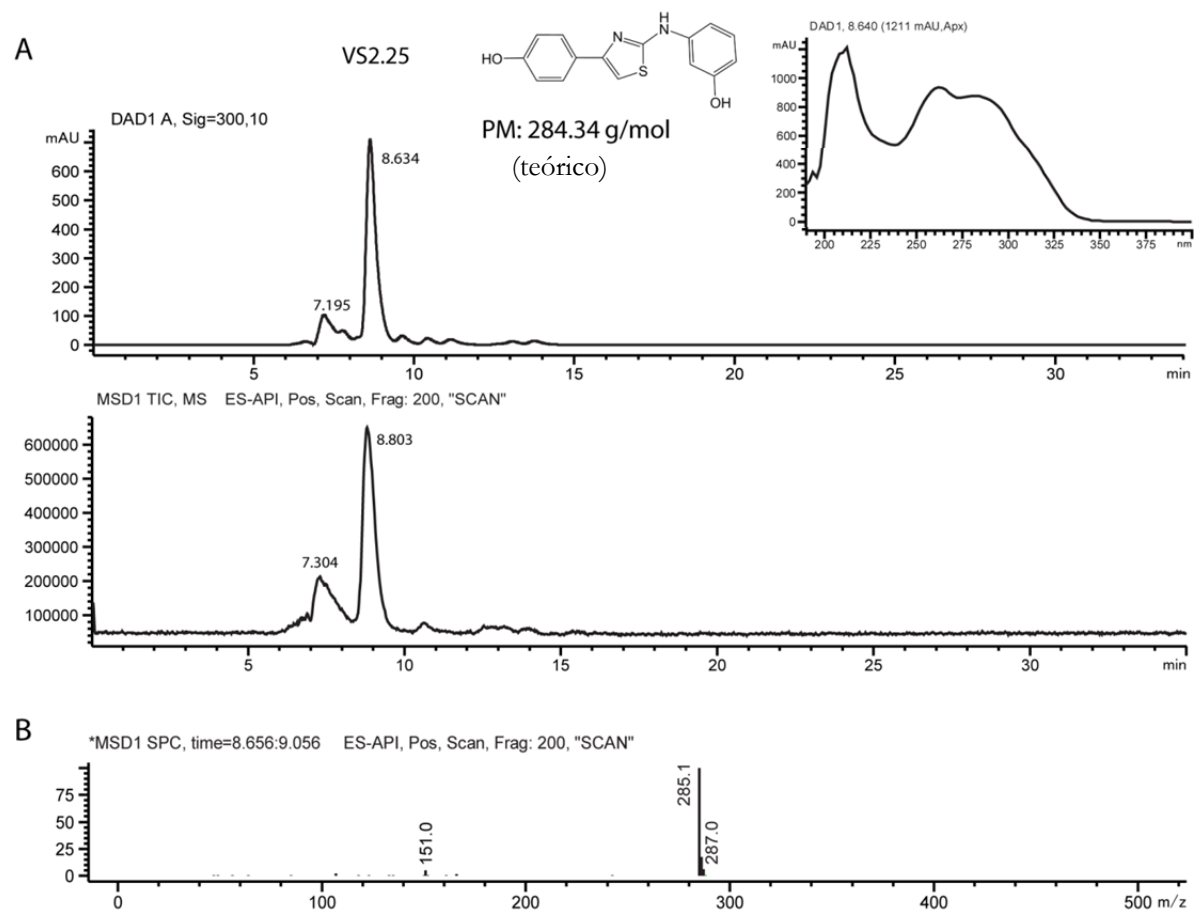




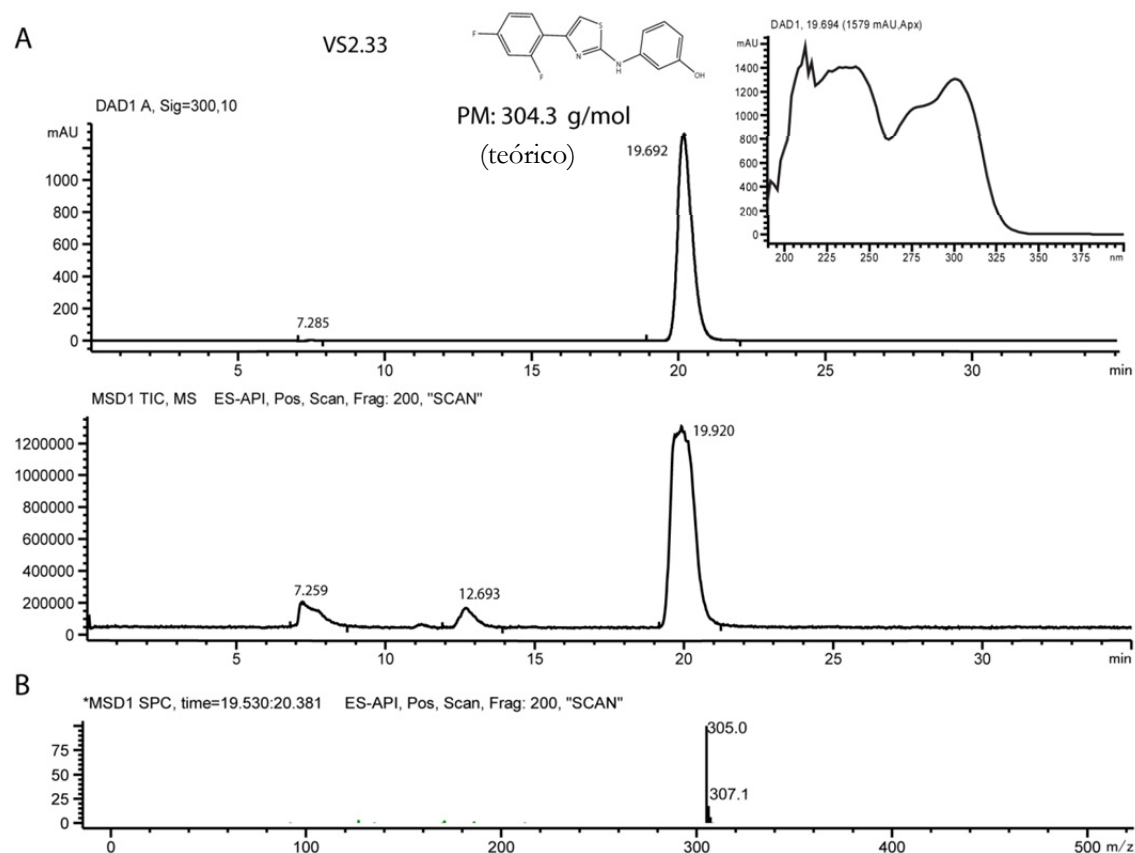
**Figura 45.** Curvas de desplazamiento del *mant*-GTP del sitio de unión del nucleótido en BsFtsZ por los ligandos obtenidos en el cribado virtual con estructura similar a VS2.18 y VS2.25 (serie VS2.31 – VS2.62). Aquellos compuestos que presentan problemas en su límite de solubilidad en presencia de BsFtsZ en estas condiciones, se muestran con un valor de  $K_d$  aproximado, tal y como se indica en la **Tabla 10** del apartado de **Resultados**. Ensayos realizados con 750 nM de BsFtsZ en tampón Hepes, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 500 nM de *mant*-GTP, 2% de DMSO y concentraciones crecientes de ligando.

## VII.2 Comprobación de la pureza e identidad química de los ligandos por HPLC-MS y RMN de los inhibidores más relevantes seleccionados por cribado virtual

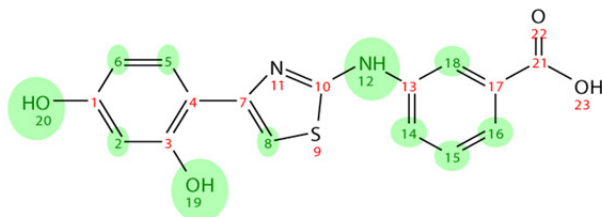
Se comprobó la pureza y la identidad de todos los compuestos comprados a casas comerciales. Se muestran los perfiles HPLC-MS de dos de ellos, VS2.25 y VS2.33 (**Figuras 46 y 47**), así como el análisis de la identidad química por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de algunos compuestos seleccionados (VS2.18, VS2.25, VS2.33, VS2.36, VS2.44 y VS2.48, **Figura 48**), que llevó a cabo el Dr. Francisco Javier Cañada Vicay (CIB-CSIC). En todos los casos la pureza de los compuestos comprados resultó ser mayor del 95%.



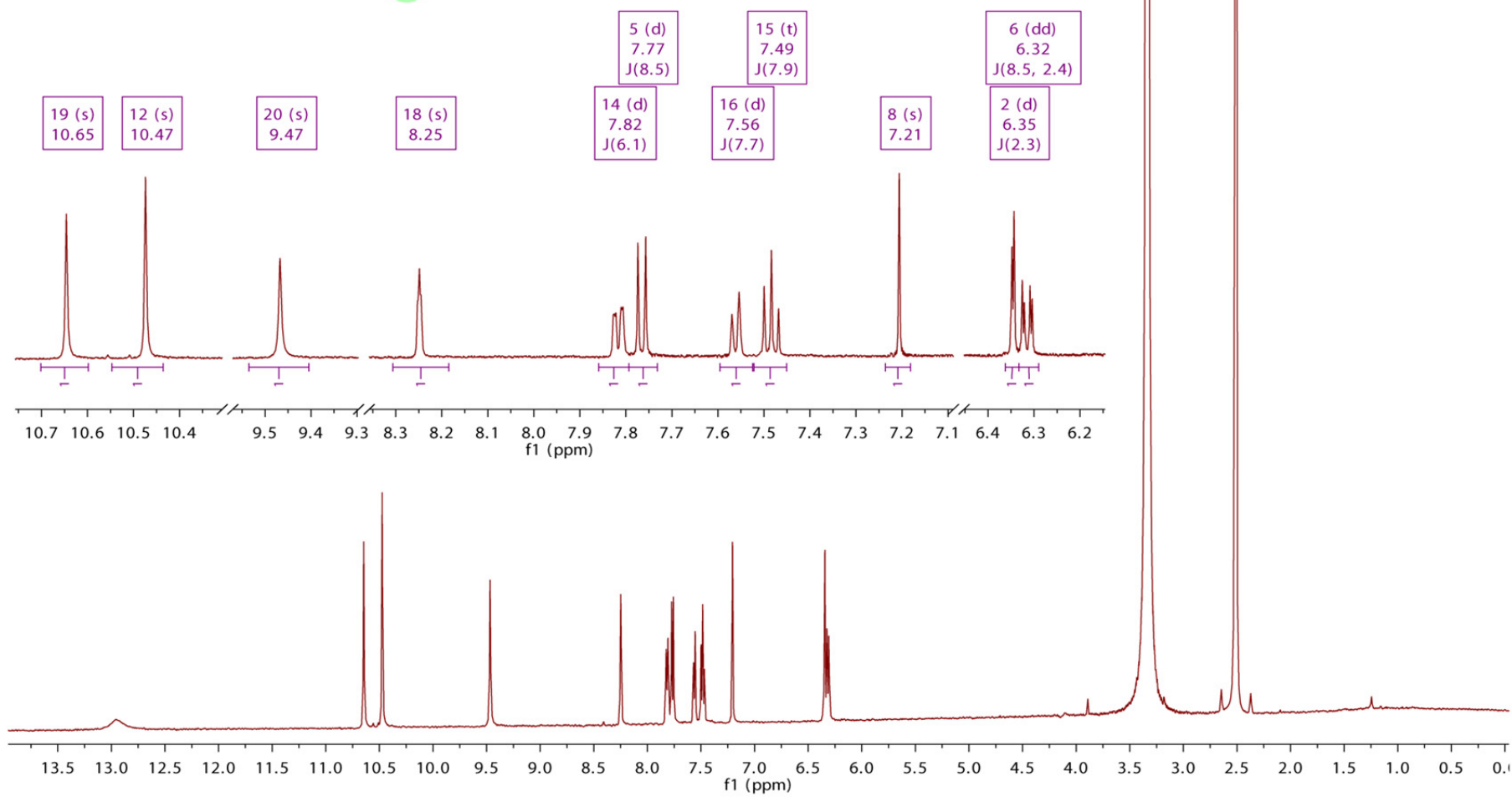
**Figura 46. Pureza e identidad química de los ligandos determinada por HPLC-MS. A.** Espectros de absorción y masas del compuesto VS2.25 analizado por HPLC-MS. Se indica el peso molecular (PM) del compuesto **B.** Las masas que aparecen en MSD1 corresponden a la masa del VS2.25 (PM: 284). El experimento se ha llevado a cabo con 40  $\mu$ L de inyección con 80% de MeOH y 0.1% de ácido fórmico como fase móvil en la columna C18 de fase reversa (Agilent Eclipse XDB-C18), con un valor de fragmentación de 200 V, con una presión del nebulizador de 50 psig, un flujo de 0.2mL/min y un gas de secado de 8L/min a una temperatura de 200 °C. El nivel de pureza del compuesto es casi del 99% y no se detectan contaminantes, a excepción del DMSO que aparece en el barrido general a tiempo 7.2, después de la fragmentación en estas condiciones.

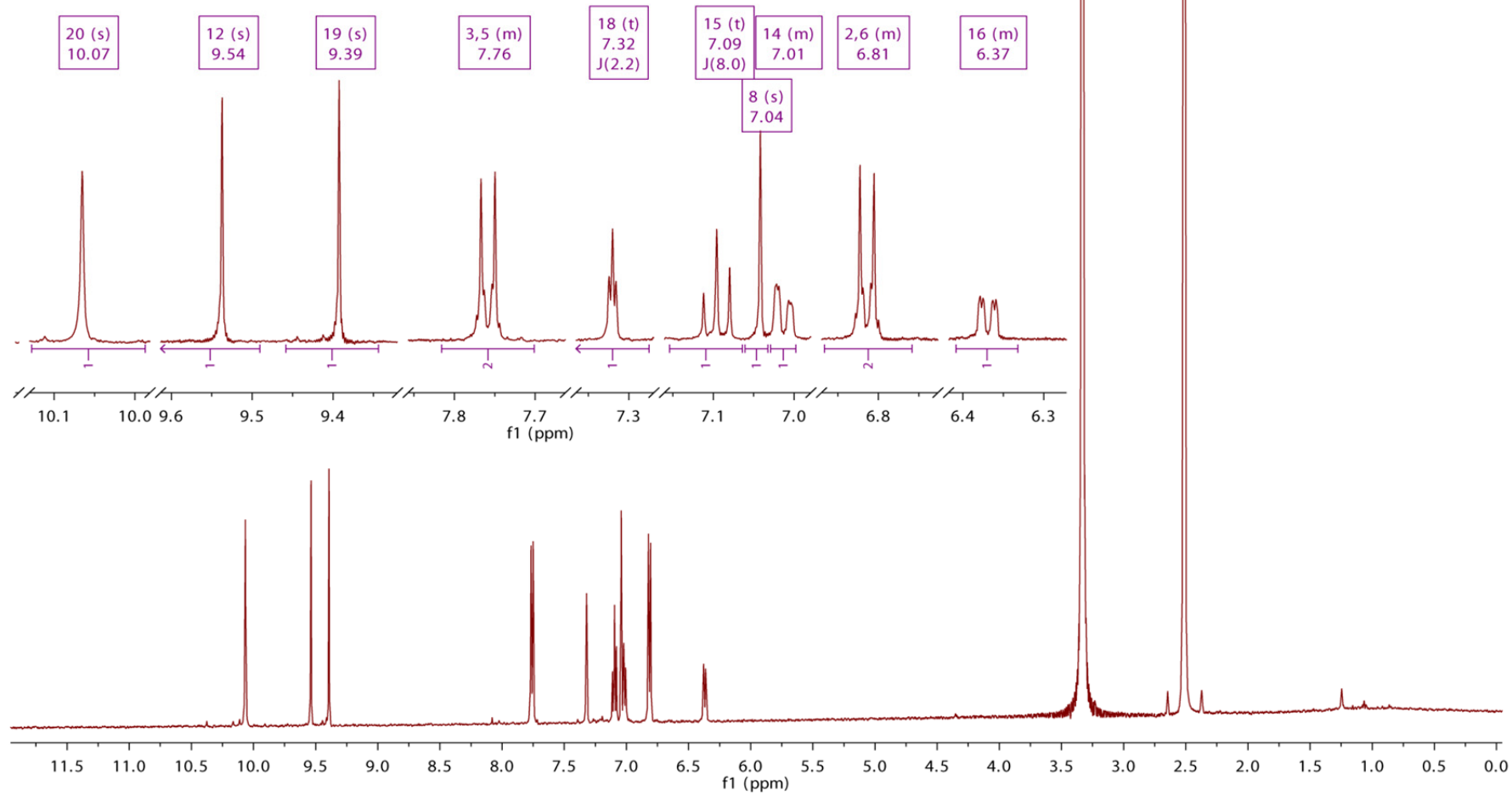
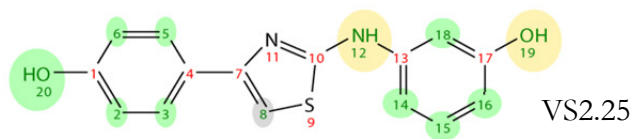


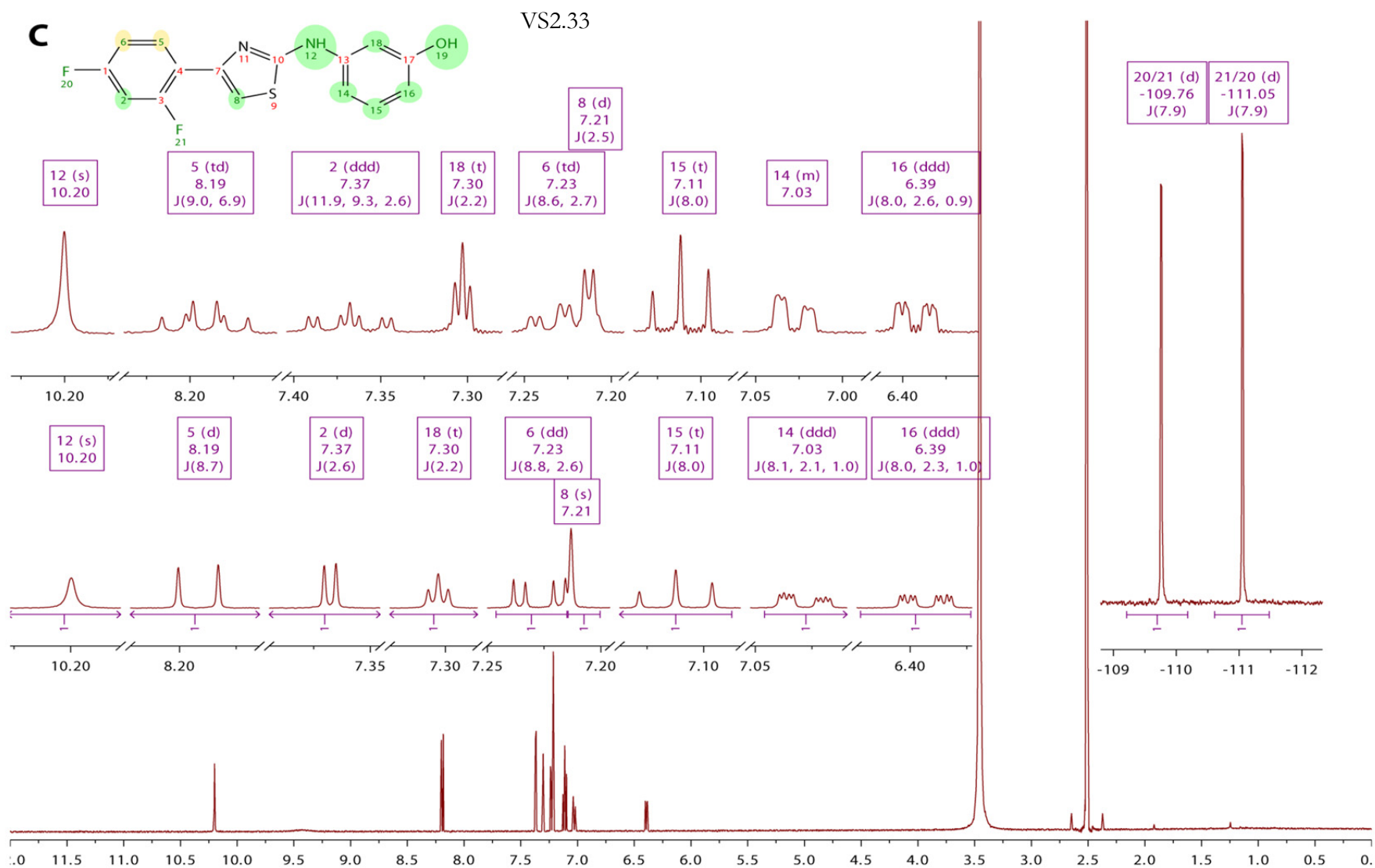
**Figura 47. Pureza e edentidad química de los ligandos por HPLC-MS. A.** Espectros de absorción y masas del compuesto VS2.33 analizado por HPLC-MS. Se indica el peso molecular (PM) del compuesto **B.** Las masas que aparecen en MSD1 corresponden a la especie monoprotonada del ligando VS2.33 (PM: 305). El experimento se ha llevado a cabo con 40  $\mu$ L de inyección con 80% de MeOH y 0.1% de ácido fórmico como fase móvil en la columna C18 de fase reversa (Agilent Eclipse XDB-C18), con un valor de fragmentación de 200 V, con una presión del nebulizador de 50 psig, un flujo de 0.2mL/min y un gas de secado de 8L/min a una temperatura de 200 °C. El nivel de pureza del compuesto es casi del 99% y no se detectan contaminantes, a excepción del DMSO que aparece en el barrido general a tiempo 7.2 y 12.7 después de la fragmentación en estas condiciones.

**A**

VS2.18

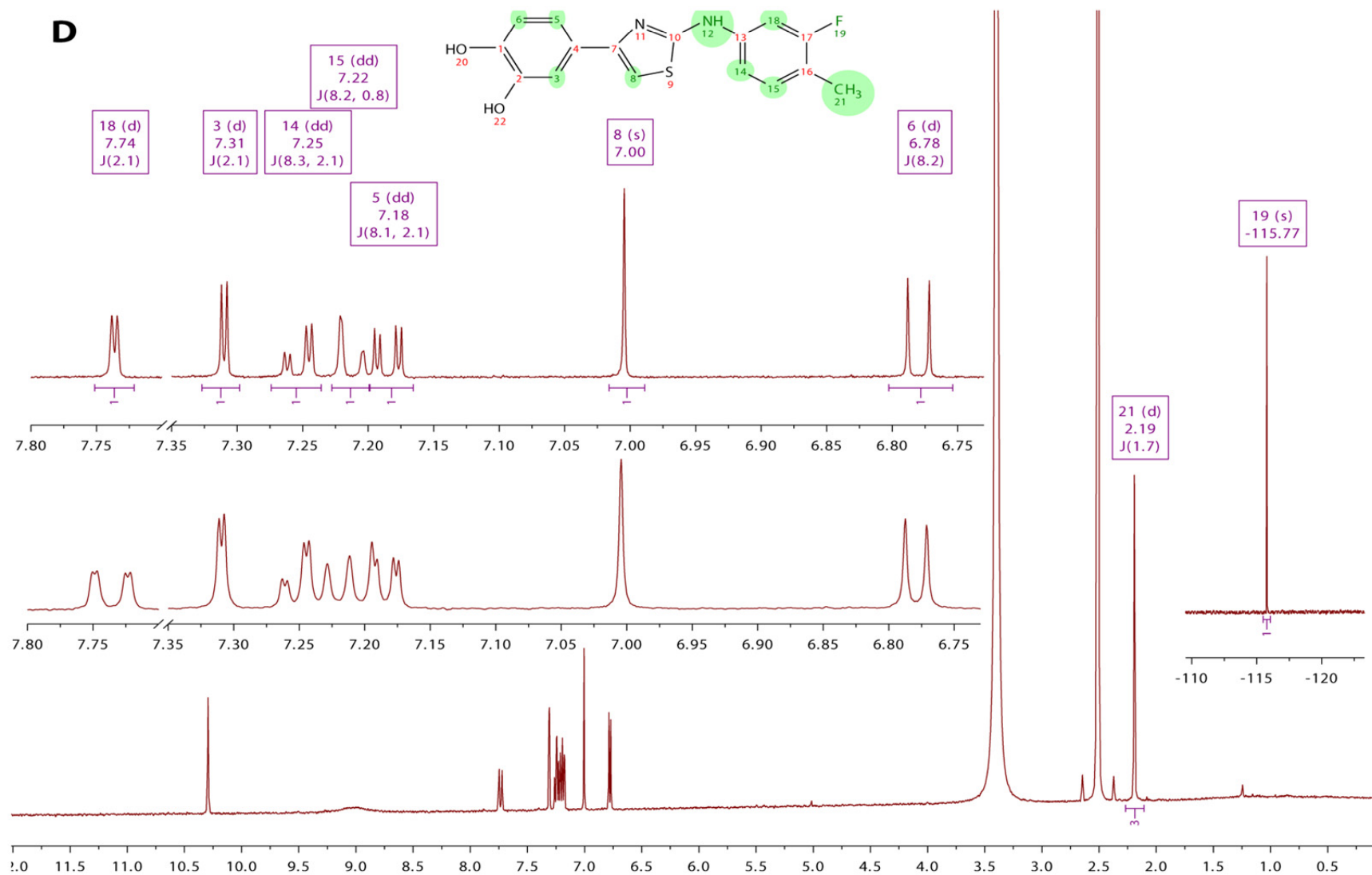


**B**



VS2.36

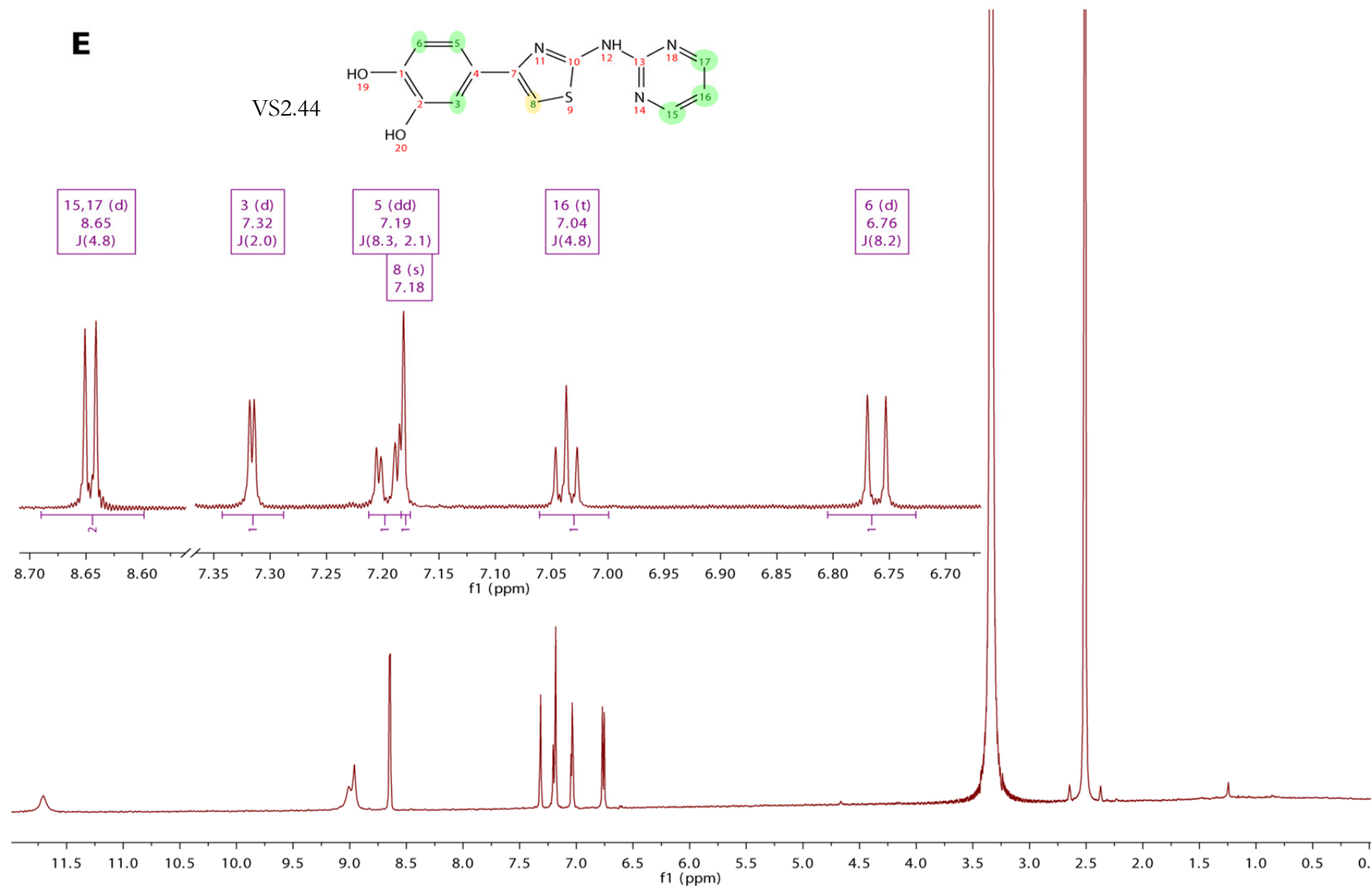
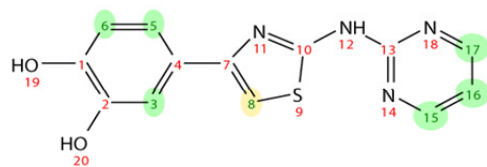
**D**

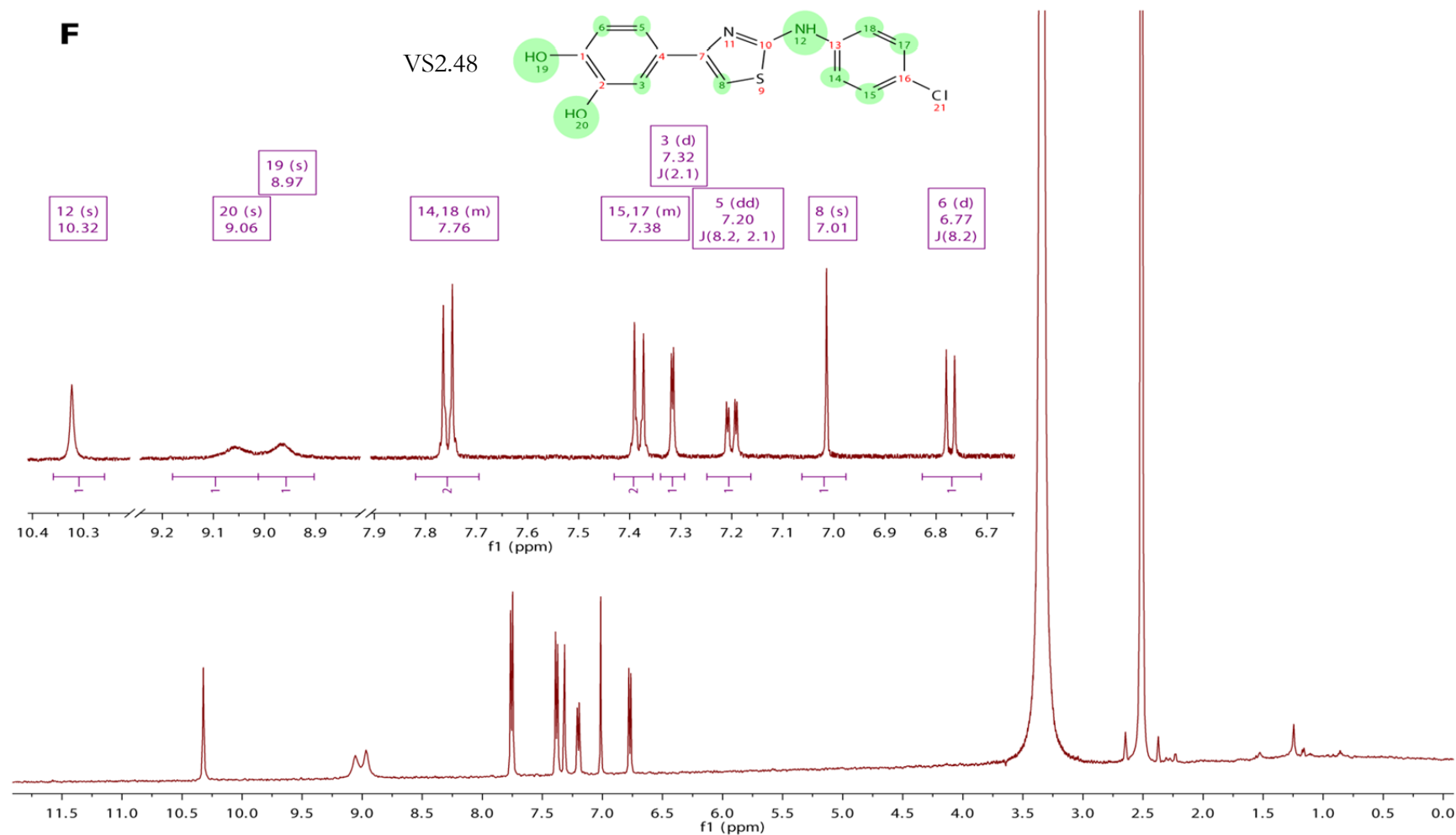




E

VS2.44





**Figura 48. Comprobación de la identidad química por RMN de los compuestos seleccionados resultantes del cribado virtual.** Se muestra en cada pico la integral redondeada a la unidad entera. La asignación de picos se ha hecho siguiendo la numeración de los átomos pesados. Se muestra el tipo de desdoblamiento de cada señal abreviado en: (s) singulete (d) doblete y (t) triplete. La asignación se ha realizado en función del desplazamiento químico y se muestran las constantes de acoplamiento en cada caso. **A.** VS2.18 **B.** VS2.25 **C.** VS2.33 **D.** VS2.36 **E.** VS2.44 **F.** VS2.48.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA

- Abagyan, R., & Totrov, M. (1994). Biased probability Monte Carlo conformational searches and electrostatic calculations for peptides and proteins. *J Mol Biol*, 235(3), 983-1002.
- Adams, D. W., & Errington, J. (2009). Bacterial cell division: assembly, maintenance and disassembly of the Z ring. *Nat Rev Microbiol*, 7(9), 642-653.
- Adams, D. W., Wu, L. J., Czaplewski, L. G., & Errington, J. (2011). Multiple effects of benzamide antibiotics on FtsZ function. *Mol Microbiol*, 80(1), 68-84.
- Amson, R., Sigaux, F., Przedborski, S., Flandrin, G., Givol, D., & Telerman, A. (1989). The human protooncogene product p33pim is expressed during fetal hematopoiesis and in diverse leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(22), 8857-8861.
- Anderson, D. E., Gueiros-Filho, F. J., & Erickson, H. P. (2004). Assembly dynamics of FtsZ rings in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* and effects of FtsZ-regulating proteins. *J Bacteriol*, 186(17), 5775-5781.
- Anderson, D. E., Kim, M. B., Moore, J. T., O'Brien, T. E., Sorto, N. A., Grove, C. I., Shaw, J. T. (2012). Comparison of small molecule inhibitors of the bacterial cell division protein FtsZ and identification of a reliable cross-species inhibitor. *ACS Chem Biol*, 7(11), 1918-1928.
- Andreu, J. M., (2007). Large scale purification of brain tubulin with the modified Weisenberg procedure. In J. Zhou (Ed.), *Microtubule protocols: Vol. 137*, (pp. 17-28) Totowa, NJ: Humana Press.
- Andreu, J. M., Schaffner-Barbero, C., Huecas, S., Alonso, D., Lopez-Rodriguez, M. L., Ruiz-Avila, L. B., Martin-Galiano, A. J. (2010). The antibacterial cell division inhibitor PC190723 is an FtsZ polymer-stabilizing agent that induces filament assembly and condensation. *J Biol Chem*, 285(19), 14239-14246.
- Andreu, J.M., & Timasheff, S.N., (1982). Tubulin bound to colchicine forms polymers different from microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 6753-6756.
- Araujo-Bazan, L., Ruiz-Avila, L. B., Andreu, D., Huecas, S., & Andreu, J. M. (2016). Cytological Profile of Antibacterial FtsZ Inhibitors and Synthetic Peptide MciZ. *Front Microbiol*, 7, 1558.
- Arora, S., Singh, S., Piazza, G. A., Contreras, C. M., Panyam, J., & Singh, A. P. (2012). Honokiol: a novel natural agent for cancer prevention and therapy. *Curr Mol Med*,

- 12(10), 1244-1252.
- Artola, M., Ruiz-Avila, L. B., Vergonos, A., Huecas, S., Araujo-Bazan, L., Martin-Fontecha, M., Lopez-Rodriguez, M. L. (2015). Effective GTP-replacing FtsZ inhibitors and antibacterial mechanism of action. *ACS Chem Biol*, 10(3), 834-843.
- Ausmees, N., Kuhn, J. R., & Jacobs-Wagner, C., (2003). The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. *Cell*, 115(6), 705-713.
- Awasthi, D., Kumar, K., Knudson, S. E., Slayden, R. A., & Ojima, I. (2013). SAR studies on trisubstituted benzimidazoles as inhibitors of Mtb FtsZ for the development of novel antitubercular agents. *J Med Chem*, 56(23), 9756-9770.
- Aylett, C. H., Lowe, J., & Amos, L. A. (2011). New insights into the mechanisms of cytomotive actin and tubulin filaments. *Int Rev Cell Mol Biol*, 292, 1-71.
- Ayliffe GA, Buckles A, Casewell MW, Cookson BD, Cox RA, Duckworth GJ, French GL, Griffiths-Jones A, Heathcock R, Humphreys H, Keane CT, Marples RR, Shanson DC, Slack R, Tebbs E. (1999) Revised guidelines for control of MRSA: applying appropriately-based recommendations. *J Hosp Infect*. 43(4):315-6
- Balasubramanian, D., Ragunathan, P. T., Fei, J., & Vanderpool, C. K. (2016). A Prophage-Encoded Small RNA Controls Metabolism and Cell Division in Escherichia coli. *mSystems*, 1(1).
- Barasoain, I., Diaz, J. F., & Andreu, J. M. (2010). Fluorescent taxoid probes for microtubule research. *Methods Cell Biol*, 95, 353-372. doi:10.1016/s0091-679x(10)95019-x
- Barot K.P., Jain, S.V., Gupta, N., Kremer, L., Singh, S., Takale, V.B., Joshi, K., Ghate, M. D. (2014). Design, synthesis and docking studies of some novel (R)-2-(4'-chlorophenyl)-3-(4'-nitrophenyl)-1,2,3,5-tetrahydrobenzo[4,5] imidazo [1,2-c]pyrimidin-4-ol derivatives as antitubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 83, 245-255.
- Beck, B. D. (1979). Polymerization of the bacterial elongation factor for protein synthesis, EF-Tu. *Eur J Biochem*, 97(2), 495-502.
- Benedec, D., Vlase, L., Oniga, I., Mot, A. C., Damian, G., Hanganu, D., Silaghi-Dumitrescu, R. (2013). Polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities for two Romanian subspecies of *Achillea distans* Waldst. et Kit. ex Willd. *Molecules*, 18(8), 8725-8739.
- Bi, E., & Lutkenhaus, J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in Escherichia coli. *Nature* 354, 161 – 164.

- Bisson-Filho, A. W., Discola, K. F., Castellen, P., Blasios, V., Martins, A., Sforca, M. L., Gueiros-Filho, F. J. (2015). FtsZ filament capping by MciZ, a developmental regulator of bacterial division. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(17), E2130-2138.
- Bisson-Filho, A. W., Hsu, Y. P., Squyres, G., Kuru, E., Wu, F., Jukes, C., Dekker, C., Holden, S.J., VanNieuwenhze, M., Brun, Y.V., Garner, E. (2017). Treadmilling by FtsZ filaments drives peptidoglycan synthesis and bacterial cell division. *Science* 355:739-743.
- Borroto A, Reyes-Garau D, Jiménez MA, Carrasco E, Moreno B, Martínez-Pasamar S, Cortés JR, Perona A, Abia D, Blanco S, Fuentes M, Arellano I, Lobo J, Heidarieh H, Rueda J, Esteve P, Cibrián D, Martínez-Riaño A, Mendoza P, Prieto C, Calleja E, Oeste CL, Orfao A, Fresno M, Sánchez-Madrid F, Alcamí A, Bovolenta P, Martín P, Villoslada P, Morreale A, Messegue A, Alarcon B. (2016). First-in-class inhibitor of the T cell receptor for the treatment of autoimmune diseases. *Sci Transl Med*, (370):370ra184.
- Bottegoni G., Kufareva I., Totrov M., Abagyan R. (2009). Four-Dimensional Docking: A Fast and Accurate Account of Discrete Receptor Flexibility in Ligand Docking *Journal of Medicinal Chemistry* 2009 52 (2), 397-406.
- Bramhill, D., & Thompson, C. M. (1994). GTP-dependent polymerization of Escherichia coli FtsZ protein to form tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(13), 5813-5817.
- Briley, K., Jr., Prepiak, P., Dias, M. J., Hahn, J., & Dubnau, D. (2011). Maf acts downstream of ComGA to arrest cell division in competent cells of B. subtilis. *Mol Microbiol*, 81(1), 23-39.
- Brown, W. J., & Rockey, D. D. (2000). Identification of an antigen localized to an apparent septum within dividing chlamydiae. *Infect Immun*, 68(2), 708-715.
- Buey, R. M., Barasoain, I., Jackson, E., Meyer, A., Giannakakou, P., Paterson, I., Diaz, J. F. (2005). Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chem Biol*, 12(12), 1269-1279.
- Buske, P. J., & Levin, P. A. (2012). Extreme C terminus of bacterial cytoskeletal protein FtsZ plays fundamental role in assembly independent of modulatory proteins. *J Biol Chem*, 287(14), 10945-10957.
- Buske, P. J., & Levin, P. A. (2013). A flexible C-terminal linker is required for proper FtsZ assembly in vitro and cytokinetic ring formation in vivo. *Mol Microbiol*, 89(2), 249-263.

- Buss, J., Coltharp, C., Huang, T., Pohlmeier, C., Wang, S. C., Hatem, C., & Xiao, J. (2013). In vivo organization of the FtsZ-ring by ZapA and ZapB revealed by quantitative super-resolution microscopy. *Mol Microbiol*, 89(6), 1099-1120.
- Chaikerasitak V, Nguyen K, Khanna K, Brilot AF, Erb ML, Coker JK, Vavilina A, Newton GL, Buschauer R, Pogliano K, Villa E, Agard DA, Pogliano J. (2017) Assembly of a nucleus-like structure during viral replication in bacteria. *Science*, 13;355(6321):194-197
- Chan, F. Y., Sun, N., Neves, M. A., Lam, P. C., Chung, W. H., Wong, L. K., Wong, K. Y. (2013). Identification of a new class of FtsZ inhibitors by structure-based design and in vitro screening. *J Chem Inf Model*, 53(8), 2131-2140
- Chen, Y., & Erickson, H. P. (2005). Rapid in vitro assembly dynamics and subunit turnover of FtsZ demonstrated by fluorescence resonance energy transfer. *J Biol Chem*, 280(23), 22549-22554.
- Chen, Y., & Erickson, H. P. (2008). In vitro assembly studies of FtsZ/tubulin-like proteins (TubZ) from Bacillus plasmids: evidence for a capping mechanism. *J Biol Chem*, 283(13), 8102-8109.
- Chen, Y., & Erickson, H. P. (2011). Conformational changes of FtsZ reported by tryptophan mutants. *Biochemistry*, 50(21), 4675-4684.
- Chen, VB, Arendall, W.B., Headd, J.J., Keedy, D.A., Immormino, R.M., Kapral, G.J. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr*, 66: 12-21.
- Chung, K. M., Hsu, H. H., Yeh, H. Y., & Chang, B. Y. (2007). Mechanism of regulation of prokaryotic tubulin-like GTPase FtsZ by membrane protein EzrA. *J Biol Chem*, 282(20), 14891-14897.
- Coates, A. R., & Hu, Y. (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Br J Pharmacol*, 152(8), 1147-1154.
- Cohen SX, Ben Jelloul M, Long F, Vagin A, Knipscheer P, Lebbink J, (2008). ARP/wARP and molecular replacement: the next generation. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr*. ; 64: 49-60
- Cooper, M. A., & Shlaes, D. (2011). Fix the antibiotics pipeline. *Nature*, 472(7341), 32.
- Corbin, B. D., Geissler, B., Sadasivam, M., & Margolin, W. (2004). Z-ring-independent interaction between a subdomain of FtsA and late septation proteins as revealed by a polar recruitment assay. *J Bacteriol*, 186(22), 7736-7744.



- Cordell, S. C., Robinson, E. J., & Lowe, J. (2003). Crystal structure of the SOS cell division inhibitor SulA and in complex with FtsZ. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7889-7894.
- Correia, J. J., Baty, L. T., & Williams, R. C., Jr. (1987). Mg<sup>2+</sup> dependence of guanine nucleotide binding to tubulin. *J Biol Chem*, 262(36), 17278-17284.
- Czaplewski, L. G., Collins, I., Boyd, E. A., Brown, D., East, S. P., Gardiner, M., Stokes, N. R. (2009). Antibacterial alkoxybenzamide inhibitors of the essential bacterial cell division protein FtsZ. *Bioorg Med Chem Lett*, 19(2), 524-527.
- Dajkovic, A., Lan, G., Sun, S. X., Wirtz, D., & Lutkenhaus, J. (2008). MinC spatially controls bacterial cytokinesis by antagonizing the scaffolding function of FtsZ. *Curr Biol*, 18(4), 235-244.
- Dajkovic, A., Mukherjee, A., & Lutkenhaus, J. (2008). Investigation of regulation of FtsZ assembly by SulA and development of a model for FtsZ polymerization. *J Bacteriol*, 190(7), 2513-2526.
- Dajkovic, A., Pichoff, S., Lutkenhaus, J., & Wirtz, D. (2010). Cross-linking FtsZ polymers into coherent Z rings. *Mol Microbiol*, 78(3), 651-668.
- de Ines, C., Leynadier, D., Barasoain, I., Peyrot, V., Garcia, P., Briand, C., Temple, C., Jr. (1994). Inhibition of microtubules and cell cycle arrest by a new 1-deaza-7,8-dihydropteridine antitumor drug, CI 980, and by its chiral isomer, NSC 613863. *Cancer Res*, 54(1), 75-84.
- den Blaauwen, T., Andreu, J. M., & Monasterio, O. (2014). Bacterial cell division proteins as antibiotic targets. *Bioorg Chem*, 55, 27-38.
- Diaz, J. F., & Andreu, J. M. (1993). Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. *Biochemistry*, 32(11), 2747-2755.
- Diaz, J. F., & Buey, R. M. (2007). Characterizing ligand-microtubule binding by competition methods. *Methods Mol Med*, 137, 245-260.
- Domadia, P. N., Bhunia, A., Sivaraman, J., Swarup, S., & Dasgupta, D. (2008). Berberine targets assembly of Escherichia coli cell division protein FtsZ. *Biochemistry*, 47(10), 3225-3234.
- Dong, P., Fan, Y., Sun, J., Lv, M., Yi, M., Tan, X., & Liu, S. (2016). A dynamic interaction process between KaiA and KaiC is critical to the cyanobacterial circadian oscillator. *Sci Rep*, 6, 25129.

- Duggirala, S., Nankar, R. P., Rajendran, S., & Doble, M. (2014). Phytochemicals as inhibitors of bacterial cell division protein FtsZ: coumarins are promising candidates. *Appl Biochem Biotechnol*, 174(1), 283-296.
- Ebersbach, G., & Gerdes, K. (2004). Bacterial mitosis: partitioning protein ParA oscillates in spiral-shaped structures and positions plasmids at mid-cell. *Mol Microbiol*, 52(2), 385-398.
- Egan, A. J., & Vollmer, W. (2013). The physiology of bacterial cell division. *Ann N Y Acad Sci*, 1277, 8-28.
- Elsen, N. L., Lu, J., Parthasarathy, G., Reid, J. C., Sharma, S., Soisson, S. M., & Lumb, K. J. (2012). Mechanism of action of the cell-division inhibitor PC190723: modulation of FtsZ assembly cooperativity. *J Am Chem Soc*, 134(30), 12342-12345.
- Emsley P, Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr*. 2004; 60: 2126-2132
- Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr*. 2010; 66: 486-501.
- Erickson, H. P. (2001). The FtsZ protofilament and attachment of ZipA--structural constraints on the FtsZ power stroke. *Curr Opin Cell Biol*, 13(1), 55-60.
- Erickson, H. P., Anderson, D. E., & Osawa, M. (2010). FtsZ in bacterial cytokinesis: cytoskeleton and force generator all in one. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(4), 504-528.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol*, 1(2), 117-126.
- Fasman, G. D. (1992). Poly-Alpha-Amino Acids - a Citation-Classic Commentary on Protein Models for Conformational Studies. *Life Sciences (Current Contents)*, 10-10.
- Friesner, R. A., Murphy, R. B., Repasky, M. P., Frye, L. L., Greenwood, J. R., Halgren, T. A., Mainz, D. T. (2006). Extra precision glide: docking and scoring incorporating a model of hydrophobic enclosure for protein-ligand complexes. *J Med Chem*, 49(21), 6177-6196.
- Gardner, K. A., Moore, D. A., & Erickson, H. P. (2013). The C-terminal linker of *Escherichia coli* FtsZ functions as an intrinsically disordered peptide. *Mol Microbiol*, 89(2), 264-275.
- Gil-Redondo, R., Estrada, J., Morreale, A., Herranz, F., Sancho, J., & Ortiz, A. R. (2009). VSDMIP: virtual screening data management on an integrated platform. *J Comput*

- Aided Mol Des, 23(3), 171-184.
- Glass, J. I., Lefkowitz, E. J., Glass, J. S., Heiner, C. R., Chen, E. Y., & Cassell, G. H. (2000). The complete sequence of the mucosal pathogen *Ureaplasma urealyticum*. *Nature*, 407(6805), 757-762.
- Goehring, N. W., & Beckwith, J. (2005). Diverse paths to midcell: assembly of the bacterial cell division machinery. *Curr Biol*, 15(13), R514-526.
- Goehring, N. W., Gonzalez, M. D., & Beckwith, J. (2006). Premature targeting of cell division proteins to midcell reveals hierarchies of protein interactions involved in divisome assembly. *Mol Microbiol*, 61(1), 33-45.
- Gromiha, M. M., Yabuki, Y., Suresh, M. X., Thangakani, A. M., Suwa, M., & Fukui, K. (2009). TMFunction: database for functional residues in membrane proteins. *Nucleic Acids Res*, 37(Database issue), D201-204.
- Gueiros-Filho, F. J., & Losick, R. (2002). A widely conserved bacterial cell division protein that promotes assembly of the tubulin-like protein FtsZ. *Genes Dev*, 16(19), 2544-2556.
- Gupta, S. C., Patchva, S., Koh, W., & Aggarwal, B. B. (2012). Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 39(3), 283-299.
- Haeusser, D. P., & Margolin, W. (2016). Splitsville: structural and functional insights into the dynamic bacterial Z ring. *Nat Rev Microbiol*, 14(5), 305-319.
- Hale, C. A., & de Boer, P. A. (1999). Recruitment of ZipA to the septal ring of *Escherichia coli* is dependent on FtsZ and independent of FtsA. *J Bacteriol*, 181(1), 167-176.
- Hale, C. A., Rhee, A. C., & de Boer, P. A. (2000). ZipA-induced bundling of FtsZ polymers mediated by an interaction between C-terminal domains. *J Bacteriol*, 182(18), 5153-5166.
- Hale, C. A., Shiomi, D., Liu, B., Bernhardt, T. G., Margolin, W., Niki, H., & de Boer, P. A. (2011). Identification of *Escherichia coli* ZapC (YcbW) as a component of the division apparatus that binds and bundles FtsZ polymers. *J Bacteriol*, 193(6), 1393-1404.
- Halgren, T. A. (1996). Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, 17(5-6), 490-519.
- Hamoen, L. W., Meile, J. C., de Jong, W., Noirot, P., & Errington, J. (2006). SepF, a novel FtsZ-interacting protein required for a late step in cell division. *Mol Microbiol*, 59(3), 989-999.
- Handler, A. A., Lim, J. E., & Losick, R. (2008). Peptide inhibitor of cytokinesis during

- sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 68(3), 588-599.
- Harry, E., Monahan, L., & Thompson, L. (2006). Bacterial cell division: the mechanism and its precision. *Int Rev Cytol*, 253, 27-94.
- Haydon, D. J., Stokes, N. R., Ure, R., Galbraith, G., Bennett, J. M., Brown, D. R., Czaplewski, L. G. (2008). An inhibitor of FtsZ with potent and selective anti-staphylococcal activity. *Science*, 321(5896), 1673-1675.
- Heinig M., Frishman D., (2004). STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins. *Nucleic Acids Res.*; 32: W500-W502.
- Hemaiswarya, S., Soudaminikkutty, R., Narasumani, M. L., & Doble, M. (2011). Phenylpropanoids inhibit protofilament formation of *Escherichia coli* cell division protein FtsZ. *J Med Microbiol*, 60(Pt 9), 1317-1325.
- Hill, N. S., Buske, P. J., Shi, Y., & Levin, P. A. (2013). A moonlighting enzyme links *Escherichia coli* cell size with central metabolism. *PLoS Genet*, 9(7), e1003663.
- Hirota, Y., Ryter, A., & Jacob, F. (1968). Thermosensitive mutants of *E. coli* affected in the processes of DNA synthesis and cellular division. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 33, 677-693.
- Holden, S. J., Pengo, T., Meibom, K. L., Fernandez Fernandez, C., Collier, J., & Manley, S. (2014). High throughput 3D super-resolution microscopy reveals *Caulobacter crescentus* in vivo Z-ring organization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(12), 4566-4571.
- Huang, Q., Tonge, P.J., Slayden, R.A., Kirikae, T., Ojima, I. (2007) FtsZ: a novel target for tuberculosis drug discovery. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 527-543.
- Huecas, S., & Andreu, J. M. (2003). Energetics of the cooperative assembly of cell division protein FtsZ and the nucleotide hydrolysis switch. *J Biol Chem*, 278(46), 46146-46154.
- Huecas, S., & Andreu, J. M. (2004). Polymerization of nucleotide-free, GDP- and GTP-bound cell division protein FtsZ: GDP makes the difference. *FEBS Lett*, 569(1-3), 43-48.
- Huecas, S., Llorca, O., Boskovic, J., Martin-Benito, J., Valpuesta, J. M., & Andreu, J. M. (2008). Energetics and geometry of FtsZ polymers: nucleated self-assembly of single protofilaments. *Biophys J*, 94(5), 1796-1806.
- Huisman, O., D'Ari, R., & Gottesman, S. (1984). Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81(14), 4490-4494.
- Hurley, K. A., Santos, T. M., Nepomuceno, G. M., Huynh, V., Shaw, J. T., & Weibel, D. B.

- (2016). Targeting the Bacterial Division Protein FtsZ. *J Med Chem*, 59(15), 6975-6998.
- Inoue, I., Ino, R., & Nishimura, A. (2009). New model for assembly dynamics of bacterial tubulin in relation to the stages of DNA replication. *Genes Cells*, 14(3), 435-444.
- Irwin, J. J., & Shoichet, B. K. (2005). ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*, 45(1), 177-182.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B. P., Petroni, G., Michailova, N., Staley, J. T. (2002). Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26), 17049-17054.
- Jorgensen, W. L., Maxwell, D. S. & Tiradorives, J., (1996). Development and testing of the OPLS all-atom force field on conformational energetics and properties of organic liquids. *J Am Chem Soc*, 118, 11225-11236.
- Justice, S. S., Garcia-Lara, J., & Rothfield, L. I. (2000). Cell division inhibitors SulA and MinC/MinD block septum formation at different steps in the assembly of the *Escherichia coli* division machinery. *Mol Microbiol*, 37(2), 410-423.
- Kabsch W., (1993). Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *J Appl Crystallogr.*; 26: 795-800.
- Karimova, G., Robichon, C., & Ladant, D. (2009). Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the *Escherichia coli* cell division machinery. *J Bacteriol*, 191(1), 333-346.
- Kaul, M., Mark, L., Parhi, A. K., LaVoie, E. J., & Pilch, D. S. (2016). Combining the FtsZ-Targeting Prodrug TXA709 and the Cephalosporin Cefdinir Confers Synergy and Reduces the Frequency of Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(7), 4290-4296.
- Kaul, M., Mark, L., Zhang, Y., Parhi, A. K., Lyu, Y. L., Pawlak, J., Pilch, D. S. (2015). TXA709, an FtsZ-Targeting Benzamide Prodrug with Improved Pharmacokinetics and Enhanced In Vivo Efficacy against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8), 4845-4855.
- Kaur, S., Modi, N. H., Panda, D., & Roy, N. (2010). Probing the binding site of curcumin in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* FtsZ--a structural insight to unveil antibacterial activity of curcumin. *Eur J Med Chem*, 45(9), 4209-4214.
- Kaminski, G. A., Friesner, R. A., Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W. L., (2001). Evaluation and reparametrization of the OPLS-AA force field for proteins via comparison with

- accurate quantumchemical calculations on peptides. *Journal of Physical Chemistry B*, 105, 6474-6487.
- Kawai, Y., Moriya, S., & Ogasawara, N. (2003). Identification of a protein, YneA, responsible for cell division suppression during the SOS response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 47(4), 1113-1122.
- Keffer, J. L., Huecas, S., Hammill, J. T., Wipf, P., Andreu, J. M., & Bewley, C. A. (2013). Chrysopaentins are competitive inhibitors of FtsZ and inhibit Z-ring formation in live bacteria. *Bioorg Med Chem*, 21(18), 5673-5678.
- Kim, S., Thiessen, P. A., Bolton, E. E., Chen, J., Fu, G., Gindulyte, A., Bryant, S. H. (2016). PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res*, 44(D1), D1202-1213.
- Kirkpatrick, C. L., & Viollier, P. H. (2011). New(s) to the (Z-)ring. *Curr Opin Microbiol*, 14(6), 691-697.
- Knudson, S. E., Awasthi, D., Kumar, K., Carreau, A., Goullieux, L., Lagrange, S., Slayden, R. A. (2014). A trisubstituted benzimidazole cell division inhibitor with efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 9(4), e93953.
- Kotan, R., Cakir, A., Dadasoglu, F., Aydin, T., Cakmakci, R., Ozer, H., Dikbas, N. (2010). Antibacterial activities of essential oils and extracts of Turkish *Achillea*, *Satureja* and *Thymus* species against plant pathogenic bacteria. *J Sci Food Agric*, 90(1), 145-160.
- Kraemer, J. A., Erb, M. L., Waddling, C. A., Montabana, E. A., Zehr, E. A., Wang, H., Pogliano, J. (2012). A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell. *Cell*, 149(7), 1488-1499.
- Krol, E., van Kessel, S. P., van Bezouwen, L. S., Kumar, N., Boekema, E. J., & Scheffers, D. J. (2012). *Bacillus subtilis* SepF binds to the C-terminus of FtsZ. *PLoS One*, 7(8), e43293.
- Kumar, K., Awasthi, D., Berger, W.T., Tonge, P.J., Slayden, R.A., Ojima, I. (2010). Discovery of anti-TB agents that target the cell-division protein FtsZ. *Future Med. Chem.*, 2, 1305-1323.
- Kundakovic, T., Fokialakis, N., Dobric, S., Pratsinis, H., Kletsas, D., Kovacevic, N., & Chinou, I. (2006). Evaluation of the anti-inflammatory and cytotoxic activities of naphthazarine derivatives from *Onosma leptantha*. *Phytomedicine*, 13(4), 290-294.
- Lakowicz, J.R. (1999). Principles of fluorescence Spectroscopy, p.p. 291-320. Kluwer Academy/Plenum Publishers, New York.
- Lamm, O. 1929. Die Differentialgleichung der Ultrazentrifugierung. *Arkiv Matematik Astronomi Fysik*. 21B:1-4.

- Lappchen, T., Pinas, V. A., Hartog, A. F., Koomen, G. J., Schaffner-Barbero, C., Andreu, J. M., den Blaauwen, T. (2008). Probing FtsZ and tubulin with C8-substituted GTP analogs reveals differences in their nucleotide binding sites. *Chem Biol*, 15(2), 189-199.
- Larsen, R. A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., & Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in *Bacillus thuringiensis*. *Genes Dev*, 21(11), 1340-1352.
- Laskowski RA, Macarthur MW, Moss DS, Thornton JM. (1993). Procheck - a Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *J Appl Crystallogr*; 26: 283-291.
- Laskowski RA, Swindells MB. (2011). LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. *J Chem Inf Model*; 51: 2778-2786.
- Laue TM, S. B., Ridgeway TM, Pelletier SL. (1992). Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. [Harding SE, Rowe AJ, Horton JC]. *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*, 90-125.
- Lepak, A. J., Parhi, A., Madison, M., Marchillo, K., VanHecker, J., & Andes, D. R. (2015). In Vivo Pharmacodynamic Evaluation of an FtsZ Inhibitor, TXA-709, and Its Active Metabolite, TXA-707, in a Murine Neutropenic Thigh Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(10), 6568-6574.
- Levin, P. A., Kurtser, I. G., & Grossman, A. D. (1999). Identification and characterization of a negative regulator of FtsZ ring formation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(17), 9642-9647.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 12(5), 371-387.
- Lindas, A. C., Karlsson, E. A., Lindgren, M. T., Ettema, T. J., & Bernander, R. (2008). A unique cell division machinery in the Archaea. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(48), 18942-18946.
- Liu, T., Pan, Y., Lai, R. (2014) New mechanism of magnolol and honokiol from *Magnolia officinalis* against *Staphylococcus aureus*. *Nat Prod Commun.*, 9(9):1307-9.
- Liu, Z., Mukherjee, A., & Lutkenhaus, J. (1999). Recruitment of ZipA to the division site by interaction with FtsZ. *Mol Microbiol*, 31(6), 1853-1861.
- Lock, R. L., & Harry, E. J. (2008). Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nat Rev Drug Discov*, 7(4), 324-338.
- Loose, M., & Mitchison, T. J. (2014). The bacterial cell division proteins FtsA and FtsZ self-

- organize into dynamic cytoskeletal patterns. *Nat Cell Biol*, 16(1), 38-46.
- Lowe, J. (1998). Crystal structure determination of FtsZ from *Methanococcus jannaschii*. *J Struct Biol*, 124(2-3), 235-243.
- Lowe, J., & Amos, L. A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature*, 391(6663), 203-206.
- Lowe, J., & Amos, L. A. (2009). Evolution of cytomotive filaments: the cytoskeleton from prokaryotes to eukaryotes. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(2), 323-329.
- Lutkenhaus, J. (2007). Assembly dynamics of the bacterial MinCDE system and spatial regulation of the Z ring. *Annu Rev Biochem*, 76, 539-562.
- Lutkenhaus, J. (2009). FtsN--trigger for septation. *J Bacteriol*, 191(24), 7381-7382.
- Lyu, Z., Coltharp, C., Yang, X., & Xiao, J. (2016). Influence of FtsZ GTPase activity and concentration on nanoscale Z-ring structure in vivo revealed by three-dimensional Superresolution imaging. *Biopolymers*, 105(10), 725-734.
- Ma, X., & Margolin, W. (1999). Genetic and functional analyses of the conserved C-terminal core domain of *Escherichia coli* FtsZ. *J Bacteriol*, 181(24), 7531-7544.
- Marcelo, F., Huecas, S., Ruiz-Avila, L. B., Canada, F. J., Perona, A., Poveda, A., Andreu, J. M. (2013). Interactions of bacterial cell division protein FtsZ with C8-substituted guanine nucleotide inhibitors. A combined NMR, biochemical and molecular modeling perspective. *J Am Chem Soc*, 135(44), 16418-16428.
- Margolin, W. (2005). FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(11), 862-871.
- Martin-Galiano, A. J., Buey, R. M., Cabezas, M., & Andreu, J. M. (2010). Mapping flexibility and the assembly switch of cell division protein FtsZ by computational and mutational approaches. *J Biol Chem*, 285(29), 22554-22565.
- Martin-Galiano, A. J., Oliva, M. A., Sanz, L., Bhattacharyya, A., Serna, M., Yebenes, H., Andreu, J. M. (2011). Bacterial tubulin distinct loop sequences and primitive assembly properties support its origin from a eukaryotic tubulin ancestor. *J Biol Chem*, 286(22), 19789-19803.
- Matsui, T., Yamane, J., Mogi, N., Yamaguchi, H., Takemoto, H., Yao, M., & Tanaka, I. (2012). Structural reorganization of the bacterial cell-division protein FtsZ from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68(Pt 9), 1175-1188.
- Mayer, F. (2003). Cytoskeletons in prokaryotes. *Cell Biol Int*, 27(5), 429-438.



- McPherson, A., & DeLucas, L. (1999). Crystal-growing in space. *Science*, 283(5407), 1459.
- Michie, K. A., & Lowe, J. (2006). Dynamic filaments of the bacterial cytoskeleton. *Annu Rev Biochem*, 75, 467-492. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142452
- Miraldi, E. R., Thomas, P. J., & Romberg, L. (2008). Allosteric models for cooperative polymerization of linear polymers. *Biophys J*, 95(5), 2470-2486.
- Monahan, L. G., Robinson, A., & Harry, E. J. (2009). Lateral FtsZ association and the assembly of the cytokinetic Z ring in bacteria. *Mol Microbiol*, 74(4), 1004-1017.
- Morlot, C., Zapun, A., Dideberg, O., & Vernet, T. (2003). Growth and division of *Streptococcus pneumoniae*: localization of the high molecular weight penicillin-binding proteins during the cell cycle. *Mol Microbiol*, 50(3), 845-855.
- Mosyak, L., Zhang, Y., Glasfeld, E., Haney, S., Stahl, M., Seehra, J., & Somers, W. S. (2000). The bacterial cell-division protein ZipA and its interaction with an FtsZ fragment revealed by X-ray crystallography. *Embo j*, 19(13), 3179-3191.
- Mukherjee, A., & Lutkenhaus, J. (1994). Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J Bacteriol*, 176(9), 2754-2758.
- Mukherjee, A., & Lutkenhaus, J. (1998). Dynamic assembly of FtsZ regulated by GTP hydrolysis. *Embo j*, 17(2), 462-469.
- Mukherjee, A., & Lutkenhaus, J. (1999). Analysis of FtsZ assembly by light scattering and determination of the role of divalent metal cations. *J Bacteriol*, 181(3), 823-832.
- Murshudov GN, Vagin AA, Dodson EJ., (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr*. 1997; 53:240-255.
- Nemethy, G., Gibson, K. D., Palmer, K. A., Yoon, C. N., Paterlini, G., Zagari, A., Scheraga, H. A. (1992). Energy parameters in polypeptides. 10. Improved geometrical parameters and nonbonded interactions for use in the ECEPP/3 algorithm, with application to proline-containing peptides. *The Journal of Physical Chemistry*, 96(15), 6472-6484.
- Nogales, E., Downing, K. H., Amos, L. A., & Lowe, J. (1998). Tubulin and FtsZ form a distinct family of GTPases. *Nat Struct Biol*, 5(6), 451-458.
- Nogales, E., Wolf, S. G., & Downing, K. H. (1998). Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 391(6663), 199-203.
- Nonejuie, P., Burkart, M., Pogliano, K., & Pogliano, J. (2013). Bacterial cytological profiling rapidly identifies the cellular pathways targeted by antibacterial molecules. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A*, 110(40), 16169-16174.
- Nonejuie, P., Trial, R. M., Newton, G. L., Lamsa, A., Ranmali Perera, V., Aguilar, J., Pogiano, K. (2016). Application of bacterial cytological profiling to crude natural product extracts reveals the antibacterial arsenal of *Bacillus subtilis*. *J Antibiot (Tokyo)*, 69(5), 353-361.
- O'Connell, K. M., Hodgkinson, J. T., Sore, H. F., Welch, M., Salmond, G. P., & Spring, D. R. (2013). Combating multidrug-resistant bacteria: current strategies for the discovery of novel antibacterials. *Angew Chem Int Ed Engl*, 52(41), 10706-10733.
- Ogino, H., Teramoto, H., Inui, M., & Yukawa, H. (2008). DivS, a novel SOS-inducible cell-division suppressor in *Corynebacterium glutamicum*. *Mol Microbiol*, 67(3), 597-608.
- Ohashi, T., Hale, C. A., de Boer, P. A., & Erickson, H. P. (2002). Structural evidence that the P/Q domain of ZipA is an unstructured, flexible tether between the membrane and the C-terminal FtsZ-binding domain. *J Bacteriol*, 184(15), 4313-4315.
- Oliva, M. A., Cordell, S. C., & Lowe, J. (2004). Structural insights into FtsZ protofilament formation. *Nat Struct Mol Biol*, 11(12), 1243-1250.
- Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., & Andreu, J. M. (2012). Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(20), 7711-7716.
- Oliva, M. A., Trambaiolo, D., & Lowe, J. (2007). Structural insights into the conformational variability of FtsZ. *J Mol Biol*, 373(5), 1229-1242. doi:10.1016/j.jmb.2007.08.056
- Pichoff, S., & Lutkenhaus, J. (2002). Unique and overlapping roles for ZipA and FtsA in septal ring assembly in *Escherichia coli*. *Embo j*, 21(4), 685-693.
- Pierce, A. C., Jacobs, M., & Stuver-Moody, C. (2008). Docking study yields four novel inhibitors of the protooncogene Pim-1 kinase. *J Med Chem*, 51(6), 1972-1975.
- Plaza, A., Keffer, J. L., Bifulco, G., Lloyd, J. R., & Bewley, C. A. (2010). Chrysopaentins A-H, antibacterial bisdiarylbutene macrocycles that inhibit the bacterial cell division protein FtsZ. *J Am Chem Soc*, 132(26), 9069-9077.
- Puig, T., Vazquez-Martin, A., Relat, J., Petriz, J., Menendez, J. A., Porta, R., Colomer, R. (2008). Fatty acid metabolism in breast cancer cells: differential inhibitory effects of epigallocatechin gallate (EGCG) and C75. *Breast Cancer Res Treat*, 109(3), 471-479.
- Radhakrishnan, S. K., Pritchard, S., & Viollier, P. H. (2010). Coupling prokaryotic cell fate and division control with a bifunctional and oscillating oxidoreductase homolog. *Dev Cell*,

- 18(1), 90-101.
- Rai, D., Singh, J. K., Roy, N., & Panda, D. (2008). Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J*, 410(1), 147-155.
- Ramirez-Aportela, E., Lopez-Blanco, J. R., Andreu, J. M., & Chacon, P. (2014). Understanding nucleotide-regulated FtsZ filament dynamics and the monomer assembly switch with large-scale atomistic simulations. *Biophys J*, 107(9), 2164-2176.
- Reynolds, R.C., Srivastava, S., Ross, L.J., Suling, W.J., White, E.L. (2004). A new 2-carbamoyl pteridine that inhibits mycobacterial FtsZ. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 3161-3164.
- Rico, A. I., Garcia-Ovalle, M., Mingorance, J., & Vicente, M. (2004). Role of two essential domains of Escherichia coli FtsA in localization and progression of the division ring. *Mol Microbiol*, 53(5), 1359-1371.
- Rico, A. I., Krupka, M., & Vicente, M. (2013). In the beginning, Escherichia coli assembled the proto-ring: an initial phase of division. *J Biol Chem*, 288(29), 20830-20836.
- Rothfield, L., Taghbalout, A., & Shih, Y. L. (2005). Spatial control of bacterial division-site placement. *Nat Rev Microbiol*, 3(12), 959-968.
- Rowlett, V. W., & Margolin, W. (2014). 3D-SIM super-resolution of FtsZ and its membrane tethers in Escherichia coli cells. *Biophys J*, 107(8), L17-20.
- Ruiz, F. M., Gil-Redondo, R., Morreale, A., Ortiz, A. R., Fabrega, C., & Bravo, J. (2008). Structure-based discovery of novel non-nucleosidic DNA alkyltransferase inhibitors: virtual screening and in vitro and in vivo activities. *J Chem Inf Model*, 48(4), 844-854.
- Ruiz-Avila, L. B., Huecas, S., Artola, M., Vergonos, A., Ramirez-Aportela, E., Cercenado, E., Andreu, J. M. (2013). Synthetic inhibitors of bacterial cell division targeting the GTP-binding site of FtsZ. *ACS Chem Biol*, 8(9), 2072-2083.
- Sarac, Z., Matejic, J. S., Stojanovic-Radic, Z. Z., Veselinovic, J. B., Dzamic, A. M., Bojovic, S., & Marin, P. D. (2014). Biological activity of Pinus nigra terpenes--evaluation of FtsZ inhibition by selected compounds as contribution to their antimicrobial activity. *Comput Biol Med*, 54, 72-78.
- Sass, P., & Brotz-Oesterhelt, H. (2013). Bacterial cell division as a target for new antibiotics. *Curr Opin Microbiol*, 16(5), 522-530.
- Schaffner-Barbero, C., Gil-Redondo, R., Ruiz-Avila, L. B., Huecas, S., Lappchen, T., den Blaauwen, T., Andreu, J. M. (2010). Insights into nucleotide recognition by cell division protein FtsZ from a mant-GTP competition assay and molecular dynamics.

- Biochemistry*, 49(49), 10458-10472.
- Schaffner-Barbero, C., Martin-Fontecha, M., Chacon, P., & Andreu, J. M. (2012). Targeting the assembly of bacterial cell division protein FtsZ with small molecules. *ACS Chem Biol*, 7(2), 269-277.
- Scheffers, D. J., de Wit, J. G., den Blaauwen, T., & Driessen, A. J. (2001). Substitution of a conserved aspartate allows cation-induced polymerization of FtsZ. *FEBS Lett*, 494(1-2), 34-37.
- Scheffers, D. J., & Driessen, A. J. (2002). Immediate GTP hydrolysis upon FtsZ polymerization. *Mol Microbiol*, 43(6), 1517-1521.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682.
- Schlieper, D., Oliva, M. A., Andreu, J. M., & Lowe, J. (2005). Structure of bacterial tubulin BtubA/B: evidence for horizontal gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(26), 9170-9175.
- Schmidt, K. L., Peterson, N. D., Kustusch, R. J., Wissel, M. C., Graham, B., Phillips, G. J., & Weiss, D. S. (2004). A predicted ABC transporter, FtsEX, is needed for cell division in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(3), 785-793.
- Schuck, P. (2000). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*, 78(3), 1606-1619.
- Shih, Y. L., Le, T., & Rothfield, L. (2003). Division site selection in *Escherichia coli* involves dynamic redistribution of Min proteins within coiled structures that extend between the two cell poles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7865-7870.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*, 24(1), 71-109.
- Soderstrom, B., & Daley, D. O. (2017). The bacterial divisome: more than a ring?, 63(2):161-164.
- Soderstrom, B., Skoog, K., Blom, H., Weiss, D. S., von Heijne, G., & Daley, D. O. (2014). Disassembly of the divisome in *Escherichia coli*: evidence that FtsZ dissociates before compartmentalization. *Mol Microbiol*, 92(1), 1-9.
- Stokes, N. R., Baker, N., Bennett, J. M., Berry, J., Collins, I., Czaplewski, L. G., Haydon, D. J. (2013). An improved small-molecule inhibitor of FtsZ with superior in vitro potency, drug-like properties, and in vivo efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(1), 317-325.

- Stokes, N. R., Sievers, J., Barker, S., Bennett, J. M., Brown, D. R., Collins, I., Errington, J. (2005). Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J Biol Chem*, 280(48), 39709-39715.
- Storoni LC, McCoy AJ, Read RJ. Likelihood-enhanced fast rotation functions. *Acta Crystallogr, Sect D: Biol Crystallogr*. 2004; 60: 432-438.
- Strauss, M. P., Liew, A. T., Turnbull, L., Whitchurch, C. B., Monahan, L. G., & Harry, E. J. (2012). 3D-SIM super resolution microscopy reveals a bead-like arrangement for FtsZ and the division machinery: implications for triggering cytokinesis. *PLoS Biol*, 10(9), e1001389.
- Sun, N., Chan, F. Y., Lu, Y. J., Neves, M. A., Lui, H. K., Wang, Y., Wong, K. Y. (2014). Rational design of berberine-based FtsZ inhibitors with broad-spectrum antibacterial activity. *PLoS One*, 9(5), e97514.
- Sundararajan, K., Miguel, A., Desmarais, S. M., Meier, E. L., Casey Huang, K., & Goley, E. D. (2015). The bacterial tubulin FtsZ requires its intrinsically disordered linker to direct robust cell wall construction. *Nat Commun*, 6, 7281.
- Szwedziak, P., Wang, Q., Bharat, T. A., Tsim, M., & Lowe, J. (2014). Architecture of the ring formed by the tubulin homologue FtsZ in bacterial cell division. *Elife*, 3, e04601.
- Tan, C. M., Therien, A. G., Lu, J., Lee, S. H., Caron, A., Gill, C. J., Roemer, T. (2012). Restoring methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* susceptibility to beta-lactam antibiotics. *Sci Transl Med*, 4(126), 126ra135.
- Tormo, A., Dopazo, A., de la Campa, A. G., Aldea, M., & Vicente, M. (1985). Coupling between DNA replication and cell division mediated by the FtsA protein in *Escherichia coli*: a pathway independent of the SOS response, the "TER" pathway. *J Bacteriol*, 164(2), 950-953.
- Totrov, M., & Abagyan, R. (1997). Flexible protein-ligand docking by global energy optimization in internal coordinates. *Proteins, Suppl 1*, 215-220.
- van den Ent, F., Amos, L. A., & Lowe, J. (2001). Prokaryotic origin of the actin cytoskeleton. *Nature*, 413(6851), 39-44.
- van den Ent, F., & Lowe, J. (2000). Crystal structure of the cell division protein FtsA from *Thermotoga maritima*. *Embo j*, 19(20), 5300-5307. doi:10.1093/emboj/19.20.5300
- van den Ent, F., Moller-Jensen, J., Amos, L. A., Gerdes, K., & Lowe, J. (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. *Embo j*, 21(24), 6935-6943.

- Vaughan, S., Wickstead, B., Gull, K., & Addinall, S. G. (2004). Molecular evolution of FtsZ protein sequences encoded within the genomes of archaea, bacteria, and eukaryota. *J Mol Evol*, 58(1), 19-29.
- Vollmer, W. (2006). The prokaryotic cytoskeleton: a putative target for inhibitors and antibiotics? *Appl Microbiol Biotechnol*, 73(1), 37-47.
- Weart, R. B., Lee, A. H., Chien, A. C., Haeusser, D. P., Hill, N. S., & Levin, P. A. (2007). A metabolic sensor governing cell size in bacteria. *Cell*, 130(2), 335-347.
- WHO. Drug resistance, antimicrobial resistance: global report on surveillance (2014). <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> (World Health Organization)
- Wishart, D. S., Knox, C., Guo, A. C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Woolsey, J. (2006). DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res*, 34, D668-672.
- Wright, G. D. (2007). The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*, 5(3), 175-186.
- Yang, X., Lyu, Z., Miguel, A., McQuillen, R., Huang, K. C., Xiao, J. (2017). GTPase activity-coupled treadmilling of the bacterial tubulin FtsZ organizes septal cell-wall synthesis. *Science* 355:744-747.

